

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR2006/001077

International filing date: 23 March 2006 (23.03.2006)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2005-0108353
Filing date: 14 November 2005 (14.11.2005)

Date of receipt at the International Bureau: 10 April 2006 (10.04.2006)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office

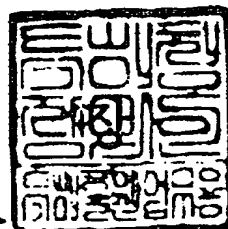
출 원 번 호 : 특허출원 2005년 제 0108353 호
Application Number 10-2005-0108353

출 원 일 자 : 2005년 11월 14일
Date of Application NOV 14, 2005

출 원 인 : 김영호
Applicant(s) kim young ho

2006 년 03 월 29 일

특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】 특허출원서

【권리구분】 특허

【수신처】 특허청장

【참조번호】 0001

【제출일자】 2005.11.14

【발명의 국문명칭】 세포혼합액 층에 자력을 인가하여 분리시킨 세포의 분리 효율을 향상시키는 방법

【발명의 영문명칭】 Method for improving separation efficiency of cells separated by supplying magnet on cell suspension layer

【출원인】

【성명】 김영호

【출원인코드】 4-2005-023434-1

【발명자】

【성명】 김영호

【출원인코드】 4-2005-023434-1

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다.

출원인

김영호 (인)

【수수료】

【기본출원료】	0 면	38,000 원
【가산출원료】	39 면	0 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	0 항	0 원
【합계】		38,000 원
【감면사유】	개인(70%감면)	

【감면후 수수료】 11,400 원

【요약서】

【요약】

이 발명은 상판부와 하판부 사이에 형성된 마그네틱 비드가 부착된 특정세포가 혼합되어 있는 세포혼합액 층의 상판부 측에서 자력을 인가하여 필요로 하는 세포를 분리한 상태에서, 필요로 하지 않는 세포들을 모두 제거하고 하판부에 수용액을 적정량을 주입 수용한 후 다시 형성시킨 혼합 수용액 층을 유지하면서 상판부와 하판부 사이의 이격 거리를 다수 회 반복 변화시켜 혼합 수용액 층을 균질화시키고 인가되는 자력에 의해 필요로 하는 세포의 분리 효율을 향상시키는 방법의 제공을 그 목적으로 한다.

상기의 목적을 달성하기 위해 이 발명의 세포혼합액 층에 자력을 인가할 때 분리되는 세포의 분리 효율을 향상시키는 방법은, 분리된 하판부의 특정세포 이외의 나머지 세포들을 모두 제거하고 하판부에 수용액만을 주입 수용한 후 상판부와 하판부 사이에서 특정세포 혼합 수용액 층을 형성시키는 단계; 상기 단계에서 형성된 혼합 수용액 층을 유지하면서 상기 상판부와 하판부 사이의 이격 거리를 다수 회 반복 변화시켜 혼합 수용액 층을 균질화시키는 단계; 상기 단계에서 균질화된 혼합 수용액 층의 상판부 측에서 인가되는 자력에 의해 혼합 수용액 층의 상판부 측으로 특정세포를 이동시키면서 중력에 의해 특정세포 이외의 나머지 세포들을 혼합 수용액 층의 하판부 측으로 이동되어지게 하는 단계; 및, 상기 단계에서 혼합 수용액 층의 상판부 측과 하판부 측으로 이동된 특정세포와 특정세포 이외의 나머지 세포들을 상기 상판부와 하판부를 서로 멀어지게 하여, 상기 상판부와 하판부에

특정세포와 특정세포 이외의 나머지 세포들로 각각 분리시키는 단계;로 이루어지는 것을 특징으로 하여 구성된다.

【대표도】

도 4a

【명세서】

【발명의 명칭】

세포혼합액 층에 자력을 인가하여 분리시킨 세포의 분리 효율을 향상시키는 방법 {Method for improving separation efficiency of cells separated by supplying magnet on cell suspension layer}

【도면의 간단한 설명】

- <1> 도 1은 마그네틱 비드가 부착된 특정세포가 혼합되어 있는 세포혼합액 층에 자력을 인가하여 세포를 분리하는 장치의 일예를 개략적으로 도시한 것이고,
- <2> 도 2a 내지 도 2f는, 도 1의 장치를 사용하여 세포혼합액으로부터 특정세포를 분리하는 과정을 개념적으로 도시한 것이고,
- <3> 도 3a 및 도 3b는 이 발명의 일 실시 예들에 따른 세포혼합액으로부터 분리된 특정세포의 분리 효율을 향상시키는 과정을 도시한 흐름도이고,
- <4> 도 4a 내지 도 4f는, 도 3a 및 도 3b의 세포혼합액으로부터 분리된 특정세포의 분리 효율을 높이는 과정을 개념적으로 도시한 것이고,
- <5> 도 5a 및 도 5b는 이 발명의 다른 실시 예들에 따른 세포혼합액으로부터 분리된 특정세포 이외의 나머지 세포들의 분리 효율을 향상시키는 과정을 도시한 흐름도이고,
- <6> 도 6a 내지 도 6g는, 도 5a 및 도 5b의 세포혼합액으로부터 분리된 특정세포 이외의 나머지 세포들의 분리 효율을 높이는 과정을 개념적으로 도시한 것이다.

<17> 구체적으로, 상기 세포 분리 장치(10)는, 도 1에 도시되어 있는 바와 같이, 상판부(11)와 하판부(12) 및 하판부 이동 수단(16)이 내부에 위치하는, 개폐 가능한 챔버(18)와, 상기 하판부 이동 수단(16)을 제어하는 한편 상기 챔버(18) 내의 상판부(11)와 하판부(12) 사이에 형성되는 세포혼합액 층의 온도를 대략 4?? 내외로 유지하고, 습도 및 O_2 , CO_2 와 같은 생체 가스의 유입을 조절하여 상기 세포가 생존하는데 최적의 환경을 유지시키도록 상기 챔버(18)의 일 측에 설치되는 제어부(17) 및, 이외에도 하부에 상기 제어부(17)의 제어 상태를 조작할 수 있게 설치되는 제어 패널이나 전면에 현재 작동 상태를 외부에 표시하기 위해 설치된 디스플레이 등으로 구성된다.

<18> 상기와 같은 구성을 갖는 세포 분리 장치(10)를 사용하여 필요로 하는 세포를 분리하는 과정은, 도 2a 내지 도 2f에서 알 수 있는 바와 같이, 먼저 분리하고자 하는 마그네틱 비드(22)가 부착된 특정세포(21)가 포함된 세포혼합액(20)을 상기 하판부(12)의 세포혼합액 수용부(15)에 주입 수용시킨 후(도 2a), 상기 제어부(17)에서 장치 제어 부분의 제어에 의해 상기 하판부 이동 수단(16)이 이동하면서 상기 하판부(12)를 상부로 이동시켜 상기 세포혼합액 수용부(15) 내에 주입 수용되어 있는 세포혼합액(20)이 상기 상판부(11)의 하측면에 흡착되면서 세포혼합액 층을 형성시킨다.(도 2b)

<19> 다음으로, 상기 제어부(17)에서 장치 제어 부분의 제어에 의해 상기 하판부 이동 수단(16)이 이동하면서 하판부(12)를 하부로 이동시켜 상기 세포혼합액 층이 형성된 상기 상판부(11)와 하판부(12) 사이의 이격 거리를 조절하여 상기 특정세포

의 분리가 최적화되는 상태를 유지시킨다.(도 2c)

<20> 다음으로, 상기 상판부(11)와 하판부(12)의 이격 거리가 최적으로 조절된 상태의 세포혼합액 층에 상기 자석(13)에서 자력이 인가되면서 상기 특정세포(21)가 세포혼합액 층의 내부에서 상기 상판부(11) 측으로 이동하게 되고, 이와 함께 특정 세포 이외의 나머지 세포들은 중력에 의해 상기 세포혼합액 층의 내부에서 하판부(12) 측으로 이동되게 함으로써 세포혼합액 층의 내부에서 분리가 일어나고(도 2d), 상기 제어부(17)에서 장치 제어 부분의 제어에 의해 상판부(11)와 하판부(12) 사이에 형성된 세포혼합액 층의 내부에서 하판부(12) 측으로 이동된 특정세포 이외의 나머지 세포들을 특정세포로부터 완전히 분리되게 하판부(12)가 다시 상판부(11)에서 멀어지도록 상기 하판부 이동 수단(16)을 이동시키게 되면(도 2e), 상기 상판부(11) 측으로 이동한 특정세포 이외의 나머지 세포들은 상기 하판부(12)로 이동되어 완전히 분리되어지므로, 이후 특정세포를 채취하여 이용하게 된다.(도 2f)

<21> 그러나, 상기 분리 과정에서 상기 상판부(11)에 특정세포 이외의 필요로 하지 않는 나머지 세포들도 함께 붙은 경우에는 채취된 특정세포를 이용하여 하고자 하는 이후 단계의 실험에 나쁜 영향을 미칠 수 있으므로, 특정세포의 분리 효율을 최대한 높일 필요가 있게 된다.

<22> 또한, 상기와 반대의 경우로서 상기 분리 과정에서 하판부(12)에 채취하고자 하는 특정세포 이외의 나머지 세포들에 특정세포가 함께 붙어 있는 경우도 마찬가지이다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<23> 이와 같은 상기의 문제점을 해결하기 위해 이 발명은, 상판부와 하판부 사이에 형성된 마그네틱 비드가 부착된 특정세포가 혼합되어 있는 세포혼합액 층의 상판부 측에서 자력을 인가하여 필요로 하는 세포를 분리한 상태에서, 필요로 하지 않는 세포들을 모두 제거하고 하판부에 수용액을 적정량을 주입 수용한 후 형성시킨 혼합 수용액 층을 유지하면서 상판부와 하판부 사이의 이격 거리를 다수 회 반복 변화시켜 혼합 수용액 층을 균질화시키고 인가되는 자력에 의해 필요로 하는 세포의 분리 효율을 향상시키는 방법의 제공을 그 목적으로 한다.

【발명의 구성】

<24> 상기의 목적을 달성하기 위해 이 발명의 세포혼합액 층에 자력을 인가할 때 분리되는 세포의 분리 효율을 향상시키는 방법은, 하판부에 수용된 마그네틱 비드가 부착된 특정세포가 혼합되어 있는 세포혼합액을, 상기 하판부의 상부에 마주하면서 위치하는 상판부 사이에서 세포혼합액 층으로 형성시키는 단계와; 상기 단계에서 형성된 세포혼합액 층의 상기 상판부 측에서 자력을 인가하여 세포혼합액 층의 상판부 측으로 특정세포를 이동시키면서 중력에 의해 특정세포 이외의 나머지 세포들을 세포혼합액 층의 하판부 측으로 이동되어지게 하는 단계; 상기 단계에서 세포혼합액 층의 상판부 측과 하판부 측으로 이동된 특정세포와 특정세포 이외의 나머지 세포들을, 상기 상판부와 하판부를 서로 멀어지게 하여 상기 상판부와 하판부에 특정세포와 특정세포 이외의 나머지 세포들로 각각 분리시키는 단계; 상기 단계에서 분리된 하판부의 특정세포 이외의 나머지 세포들을 모두 제거하고 하판부

에 수용액만을 주입 수용한 후 상판부와 사이에서 특정세포 혼합 수용액 층을 형성시키는 단계; 상기 단계에서 형성된 혼합 수용액 층을 유지하면서 상기 상판부와 하판부 사이의 이격 거리를 다수 회 반복 변화시켜 혼합 수용액 층을 균질화시키는 단계; 상기 단계에서 균질화된 혼합 수용액 층의 상판부 측에서 인가되는 자력에 의해 혼합 수용액 층의 상판부 측으로 특정세포를 이동시키면서 중력에 의해 특정세포 이외의 나머지 세포들을 혼합 수용액 층의 하판부 측으로 이동되어지게 하는 단계; 및, 상기 단계에서 혼합 수용액 층의 상판부 측과 하판부 측으로 이동된 특정세포와 특정세포 이외의 나머지 세포들을 상기 상판부와 하판부를 서로 멀어지게 하여, 상기 상판부와 하판부에 특정세포와 특정세포 이외의 나머지 세포들로 각각 분리시키는 단계;로 이루어지는 것을 특징으로 하여 구성된다.

<25> 또한, 상기의 목적을 달성하기 위해 이 발명의 세포혼합액 층에 자력을 인가할 때 분리되는 세포의 분리 효율을 향상시키는 방법은, 하판부에 수용된 마그네틱 비드가 부착된 특정세포가 혼합되어 있는 세포혼합액을, 상기 하판부의 상부에 마주하면서 위치하는 상판부 사이에서 세포혼합액 층으로 형성시키는 단계와; 상기 단계에서 형성된 세포혼합액 층의 상기 상판부 측에서 자력을 인가하여 세포혼합액 층의 상판부 측으로 특정세포를 이동시키면서 중력에 의해 특정세포 이외의 나머지 세포들을 세포혼합액 층의 하판부 측으로 이동되어지게 하는 단계; 상기 단계에서 세포혼합액 층의 상판부 측과 하판부 측으로 이동된 특정세포와 특정세포 이외의 나머지 세포들을, 상기 상판부와 하판부를 서로 멀어지게 하여 상기 상판부와 하판부에 특정세포와 특정세포 이외의 나머지 세포들로 각각 분리시키는

단계; 상기 단계에서 분리된 상판부의 특정세포를 모두 제거하고 상기 하판부에 수용액을 추가로 적정량 주입 수용한 후 상판부와 사이에서 특정세포 이외의 나머지 세포 혼합 수용액 층을 형성시키는 단계; 상기 단계에서 형성된 혼합 수용액 층을 유지하면서 상기 상판부와 하판부 사이의 이격 거리를 다수 회 반복 변화시켜 혼합 수용액 층을 균질화시키는 단계; 상기 단계에서 균질화된 혼합 수용액 층의 상기 상판부 측에서 인가되는 자력에 의해 혼합 수용액 층의 상판부 측으로 특정세포를 이동시키면서 중력에 의해 특정세포 이외의 나머지 세포들을 혼합 수용액 층의 하판부 측으로 이동되어지게 하는 단계; 및, 상기 단계에서 혼합 수용액 층의 상판부 측과 하판부 측으로 이동된 특정세포와 특정세포 이외의 나머지 세포들을 상기 상판부와 하판부를 서로 멀어지게 하여, 상기 상판부와 하판부에 특정세포와 특정세포 이외의 나머지 세포들로 각각 분리시키는 단계;로 이루어지는 것을 특징으로 하여 구성된다.

<26> 바람직하게는, 상기 균질화시킨 세포혼합액 층을 이루는 상판부와 하판부 사이의 이격 거리를 조절하는 단계;를 상기 혼합 수용액 층을 균질화시키는 단계와, 상기 균질화된 혼합 수용액 층의 상기 상판부 측에서 자력을 인가하여 혼합 수용액 층의 상판부 측으로 특정세포를 이동시키면서 중력에 의해 특정세포 이외의 나머지 세포들을 혼합 수용액 층의 하판부 측으로 이동되어지게 하는 단계 사이에 추가로 수행하게 하여도 좋다.

<27> 바람직하게는, 상기 특정세포 이외의 나머지 세포 혼합 수용액 층을 형성시키는 단계에서, 상기 하판부에 추가로 수용액을 주입 수용시키고 상기 세포 혼합

수용액 내의 세포들이 충분히 가라앉은 상태가 되도록 일정 시간 동안 유지한 후 상기 특정세포 이외의 나머지 세포 혼합 수용액 층을 형성시키는 단계;를 수행하게 하여도 좋다.

<28> 이하에서 이 발명의 실시 예들에 따른 층 형태의 세포혼합액에 자력을 인가하여 분리된 세포의 분리 효율을 향상시키는 방법에 대해 첨부된 도면을 참조하여 상세하게 설명하면 다음과 같다.

<29> 도 3a 및 도 3b는 이 발명의 일 실시 예들에 따른 세포혼합액으로부터 분리된 특정세포의 분리 효율을 향상시키는 과정을 도시한 흐름도이고, 도 4a 내지 도 4f는 도 3a 및 도 3b의 세포혼합액으로부터 분리된 특정세포의 분리 효율을 높이는 과정을 개념적으로 도시한 것이다.

<30> 이 발명의 실시 예들에 따른 세포 분리의 효율을 향상시키는 방법을 구현하기 위해 사용되어지는 세포 분리 장치는, 도 1에 도시되어 있는 세포 분리 장치(10)와 동일하여 상세한 설명은 생략하고, 상기와 같은 구성을 갖는 세포 분리 장치(10)를 사용하여 특정세포를 분리하는 과정을 상세하게 설명한다.

<31> 상기 하판부(12)에 수용된 마그네틱 비드가 부착된 특정세포가 혼합되어 있는 세포혼합액을, 상기 하판부(12)의 상부에 마주하면서 위치하는 상판부(11) 사이에서 세포혼합액 층으로 형성시키고(S31), 상기 단계 S31에서 형성된 세포혼합액 층의 상기 상판부(11) 측에서 자력을 인가하여 세포혼합액 층의 상판부(11) 측으로 특정세포를 이동시키면서 중력에 의해 특정세포 이외의 나머지 세포들을 세포혼합액 층의 하판부(12) 측으로 이동되어지게 한 후(S32), 상기 단계 S32에서 세

포혼합액 층의 상판부(11) 측과 하판부(12) 측으로 이동된 특정세포와 특정세포 이외의 나머지 세포들을, 상기 상판부(11)와 하판부(12)를 서로 멀어지게 하여 상기 상판부(11)와 하판부(12)에 특정세포와 특정세포 이외의 나머지 세포들로 각각 분리시키는 과정(S33)을 통해 상판부(11)에서 필요로 하는 특정세포를 분리해 낸다.

<32> 이때, 상기 상판부(11)에 흡착되는 세포들은 모두 특정세포이어야 하겠지만, 실제로는 특정세포가 상기 자석(13)에서 인가되는 자력에 의해 상기 상판부(11) 측으로 끌려 갈 때 함께 엉겨 붙어 있던 특정세포 이외의 나머지 세포들이 일부 포함되게 된다.

<33> 이로부터, 상기 상판부(11)에 흡착되어 있는 필요로 하지 않는 특정세포 이외의 나머지 세포들을 분리해 내기 위해 다음 과정을 수행한다.

<34> 먼저, 특정세포와 함께 엉겨 붙어있는 특정세포 이외의 나머지 세포들의 분리를 최적화시키는 환경을 조성하기 위해, 상기 단계 S33에서 분리된 하판부(12)의 특정세포 이외의 나머지 세포들을 모두 제거하거나 또는 새로운 하판부(12)로 교체하고 상기 세포혼합액 수용부(15)에 세포들이 포함되어 있지 않은 버퍼 수용액을 주입 수용한 후(도 4a) 특정세포가 존재하는 상판부(11)와의 사이에서 특정세포 혼합 수용액 층을 형성(도 4b)시킨다.(S34)

<35> 다음으로, 상기 단계 S34에서 형성된 혼합 수용액 층을 유지하면서 상기 상판부(11)와 하판부(12) 사이의 이격 거리를 다수 회, 예를 들면 3~5회 반복 변화시켜 혼합 수용액 층을 균질화(도 4c 와 도 4b를 반복)시킨다.(S35)

<36> 그러면, 특정세포 혼합 수용액 층을 유지한 상태로 상하로 최대한 흔들려

주게 되어 상기 자석(13)에 반응하는 특정세포와 엉겨 붙은 채 상판부(11)에 붙어 있던 특정세포 이외의 나머지 세포들이 떨어지면서 단일세포화(single cell state) 되어 중력에 의해 하판부(12) 측으로 이동하게 된다.

<37> 다음으로, 상기 단계 S35에서 균질화시킨 혼합 수용액 층을 이루는 상판부(11)와 하판부(12) 사이의 이격 거리를 조절하여 세포 분리를 최적화하는 상태로 유지(도 4d)시켜(S36), 상기 단계 S36에서 균질화된 혼합 수용액 층의 상판부(11) 측에서 인가되는 자력에 의해 혼합 수용액 층의 상판부(11) 측으로 특정세포를 이동시키면서 중력에 의해 특정세포 이외의 나머지 세포들을 혼합 수용액 층의 하판부(12) 측으로 이동되어지게 한다.(S37)

<38> 마지막으로, 상기 단계 S37에서 혼합 수용액 층의 상판부(11) 측과 하판부(12) 측으로 이동된 특정세포와 특정세포 이외의 나머지 세포들을 상기 상판부(11)와 하판부(12)를 서로 멀어지게 하여(도 4e), 상기 상판부(11)와 하판부(12)에 특정세포와 특정세포 이외의 나머지 세포들로 각각 분리(도 4f)시킨다.(S38)

<39> 이로부터, 상기 단계 S33에서 분리된 특정세포에 포함되어 있던 필요로 하지 않는 특정세포 이외의 나머지 세포들을 추가로 분리하여 상판부(11)로부터 제거함으로써 필요로 하는 특정세포의 분리 비율을 높일 수 있게 된다.

<40> 이상에서는, 마그네틱 비드(22)가 부착된 특정세포(21)가 포함된 세포혼합액(20)으로부터 분리된 특정세포의 분리 효율을 높이는 과정에 대해 설명하고 있지만, 마찬가지로 하판부(12) 측으로 이동한 특정세포 이외의 나머지 세포들에 대해서도 적용할 수 있다.

<41> 도 5a 및 도 5b는 이 발명의 다른 실시 예들에 따른 세포혼합액으로부터 분리된 특정세포 이외의 나머지 세포들의 분리 효율을 향상시키는 과정을 도시한 흐름도이고, 도 6a 내지 도 6g는, 도 5a 및 도 5b의 세포혼합액으로부터 분리된 특정세포 이외의 나머지 세포들의 분리 효율을 높이는 과정을 개념적으로 도시한 것이다.

<42> 상기 하판부(12)에 수용된 마그네틱 비드가 부착된 특정세포가 혼합되어 있는 세포혼합액을, 상기 하판부(12)의 상부에 마주하면서 위치하는 상판부(11) 사이에서 세포혼합액 층으로 형성시키고(S51), 상기 단계 S51에서 형성된 세포혼합액 층의 상기 상판부(11) 측에서 자력을 인가하여 세포혼합액 층의 상판부(11) 측으로 특정세포를 이동시키면서 중력에 의해 특정세포 이외의 나머지 세포들을 세포혼합액 층의 하판부(12) 측으로 이동되어지게 한 후(S52), 상기 단계 S52에서 세포혼합액 층의 상판부(11) 측과 하판부(12) 측으로 이동된 특정세포와 특정세포 이외의 나머지 세포들을, 상기 상판부(11)와 하판부(12)를 서로 멀어지게 하여 상기 상판부(11)와 하판부(12)에 특정세포와 특정세포 이외의 나머지 세포들로 각각 분리시키는 과정(S53)을 통해 하판부(12)에서 필요로 하는 특정세포 이외의 나머지 세포들을 분리해 낸다.

<43> 이때, 상기 하판부(12)에 흡착되는 세포들은 모두 특정세포 이외의 나머지 세포들이어야 하겠지만, 실제로는 특정세포 이외의 나머지 세포들이 중력에 의해 하판부(12) 측으로 내려갈 때 함께 엉겨 붙어 눌러 있던 특정세포가 일부 포함되게 된다.

<44> 이로부터, 상기 하판부(12)에 흡착되어 있는 필요로 하지 않는 특정세포를 분리해 내기 위해 다음 과정을 수행한다.

<45> 먼저, 특정세포 이외의 나머지 세포들과 함께 엉겨 붙어있는 특정세포의 분리를 최적화시키는 환경을 조성하기 위해, 상기 단계 S53에서 분리된 상판부(11)의 특정세포를 모두 제거하거나 또는 새로운 상판부(11)로 교체하고 특정세포 이외의 나머지 세포들이 분리되어 있는 상기 세포혼합액 수용부(15)에 세포들이 포함되어 있지 않은 버퍼 수용액을 상판부(11)로 이동한 특정세포를 보충하는 정도의 적정량을 주입 수용한 후(도 6a) 특정세포가 존재하지 않는 상판부(11)와의 사이에서 특정세포 이외의 나머지 세포 혼합 수용액 층을 형성(도 6c)시킨다.(S54)

<46> 이 경우, 하판부(12)에 주입 수용된 버퍼 수용액에 의해 동요하는 특정세포 이외의 나머지 세포 혼합수용액 층 내의 세포들이 충분히 가라앉은 상태가 될 때까지 일정 시간, 예를 들면 1~2분 동안 유지시켜 분리 효율이 낮아지는 것을 방지(도 6b)한다.

<47> 다음으로, 상기 단계 S54에서 형성된 혼합 수용액 층을 유지하면서 상기 상판부(11)와 하판부(12) 사이의 이격 거리를 다수 회 반복 변화시켜 혼합 수용액 층을 균질화(도 6d와 도 6c를 반복)시킨다.(S55)

<48> 그러면, 혼합 수용액 층을 유지한 상태로 상하로 최대한 흔들려 주게 되어 상기 중력에 의해 하판부(12)로 내려가는 특정세포 이외의 나머지 세포들과 엉겨 붙은 채 하판부(11)에 붙어 있던 특정세포가 떨어지면서 상기 자석(13)에서 인가되는 자력에 의해 상판부(11) 측으로 이동하게 된다.

<49> 다음으로, 상기 단계 S55에서 균질화시킨 혼합 수용액 층을 이루는 상판부(11)와 하판부(12) 사이의 이격 거리를 조절하여 세포 분리를 최적화하는 상태로 유지(도 6e)시켜(S56), 상기 단계 S56에서 균질화된 혼합 수용액 층의 상판부(11) 측에서 인가되는 자력에 의해 혼합 수용액 층의 상판부(11) 측으로 특정세포를 이동시키면서 중력에 의해 특정세포 이외의 나머지 세포들을 혼합 수용액 층의 하판부(12) 측으로 이동되어지게 한다.(S57)

<50> 마지막으로, 상기 단계 S57에서 혼합 수용액 층의 상판부(11) 측과 하판부(12) 측으로 이동된 특정세포와 특정세포 이외의 나머지 세포들을 상기 상판부(11)와 하판부(12)를 서로 멀어지게 하여(도 6f), 상기 상판부(11)와 하판부(12)에 특정세포와 특정세포 이외의 나머지 세포들로 각각 분리(도 6g)시킨다.(S58)

<51> 이로부터, 상기 단계 S53에서 분리된 특정세포 이외의 나머지 세포들에 포함되어 있던 필요로 하지 않는 특정세포를 추가로 분리하여 하판부(11)로부터 제거함으로써 필요로 하는 특정세포 이외의 나머지 세포들의 분리 비율을 높일 수 있게 된다.

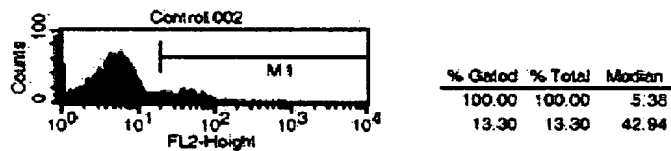
<52> 상기과 같은 이 발명의 실시 예에 따른 세포혼합액 층에 자력을 인가하여 분리시킨 세포의 분리 효율을 향상시키는 과정을 구체적으로 실험한 예를 설명하면 다음과 같다.

<53> 이 발명에서 설명하는 실험 예 1과 2는, 특정세포(이하에서는, "포지티브"라 함)가 특정세포 이외의 나머지 세포들(이하에서는, "네거티브"라 함)이 들어 있는 하판부(12)의 혼합 수용액(이하에서는, "네거티브 수용액"이라 함)에 어느 정도

포함되어 있는가를 체크하는 것에 의해 분리 에러를 확인할 수 있도록, 분리 후에 네거티브 수용액을 수거하여 세포의 상태를 측정한 것이다.

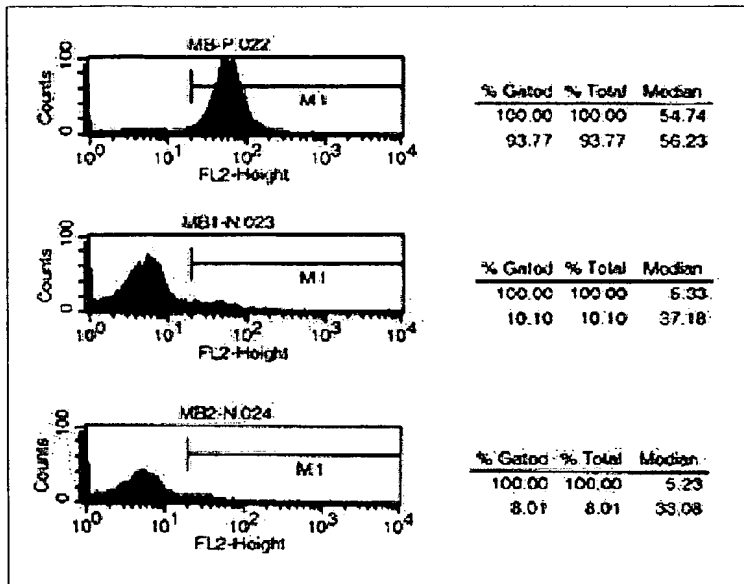
<54> 기본적으로 실험 예 1과 2에서 사용된 세포는 Ter119의 항체에 반응하는 세포들이고, 상기 자석(13)에서 인가되는 자력에 노출된 시간은 실험 예 1에서는 10분으로 실험 예 2에서는 7분으로 한다.

【표 1】



<56> 먼저, 실험 예 1에서는, 표 1에서 알 수 있는 바와 같이, 분리하고자 하는 세포혼합액 내에 특정세포가 13.30%(여기서, Control.002는 대조군을 의미하며, 분리를 위해 사용하는 세포혼합액의 상태를 실험하기 전에 측정함으로서 세포의 상태와 분리 효율을 비교하는데 사용) 존재했을 때의 분리 결과는 다음과 같다.

【표 2】



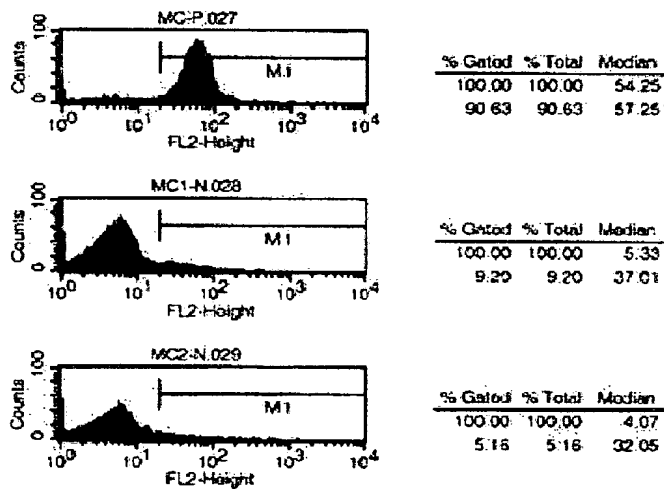
<58> 표 2에서 알 수 있는 바와 같이, 네거티브 수용액을 자력에 10분간 노출시켰을 때, MB-P.022는 분리하고 난 후 포지티브의 상태를 측정한 것으로 93.77%의 분리 효율을 보였다. 그와 동시에 네거티브에는 10.10%의 포지티브들이 포함되어져 있음을 MB1-N.023을 통해 알 수 있다.

<59> 여기서, 10.10%의 포지티브들을 포함하고 있는 네거티브 수용액 속에서, 포지티브를 제거하여 상대적으로 네거티브의 순도를 높이기 위해, 이 발명의 분리 효율 향상 방법을 1회 실시하였는바, 포지티브(MB-P.022)를 분리하고 난 후 동시에 생겨나는 네거티브(MB1-N.0.23) 내에 포지티브를 예러로 생각하여 조사된 비율이 최초 비율(10.10%) 보다 2.09%가 떨어진 8.01%임을 확인할 수 있었다.

<60> 이로 인해, 네거티브 수용액 속에 애러로 포함되어 있던 포지티브는 약 20.7%의 감소와 동시에 네거티브는 상대적으로 약 2.3%의 순도가 높아지게 됨을 확인하였다.

<61> 다음으로, 실험 예 2에서는, 실험 예 1과 같은 네거티브 수용액을 사용하되 자력에 노출된 시간을 7분으로 하여 동일한 실험을 반복해 보았다.

【표 3】



<63> 표 3에서 알 수 있는 바와 같이, MC-P.027은 분리하고 난 후, 포지티브의 상태를 측정한 것으로 90.63%의 분리 효율을 보였다.

<64> 그와 동시에 네거티브에는 9.2%의 포지티브들이 포함되어져 있음을 MC1-N.028을 통해 알 수 있다.

<65> 여기서, 9.2%의 포지티브들을 포함하고 있는 네거티브 수용액 속에서, 포지

티브를 제거하여 상대적으로 네거티브의 순도를 높이기 위해, 이 발명의 분리 효율 향상 방법을 1회 실시하였는바, 포지티브(MC-P.027)를 분리하고 난 후 동시에 생겨나는 네거티브(MC1-N.0.28) 내에 포지티브를 에러로 생각하여 조사된 비율이 최초 비율(9.2%) 보다 4.04%가 떨어진 5.16%를 확인할 수 있었다.

<66> 이로 인해, 네거티브 속에 에러로 포함되어 있던 포지티브는 약 43.9%의 감소함과 동시에 네거티브는 상대적으로 약 4.4%의 순도가 높아지게 됨을 확인하였다.

<67> 또한, 포지티브 농축의 경우, 같은 세포 수용액(Sca1에 반응하는 세포를 대상으로 함)을 가지고 동일한 조건(자력에 노출시간: 10분)에서 두 번 반복 실험(A, B) 하였다.

		포지티브	포지티브농축	네거티브 (포지티브에러)
Ctrl		2.09		
M사(Miltenyi biotec)의 분리기		5.75		2.70
총 타입의 분리기에 의한 분리	A	6.11 [%]	13.02 [%]	2.87 [%]
	B	6.30 [%]	13.55 [%]	2.51 [%]

<69> 위 표에서 보이듯이, 2.09%의 포지티브를 가지고 있는 세포를 대상으로 분리하였을 때, M사(Miltenyi biotec)의 분리기로 포지티브는 5.75%, 네거티브의 에러는 2.7% 였다.

<70> 반면에 총 타입의 분리기로 얻는 값은 포지티브의 경우 6.11%와 6.30%, 네거

티브의 경우 2.87%, 2.51%로 확인되었다.

<71> 추가로, 특정세포의 비율이 2.09%로 작기에 포지티브를 대상으로 본 특허에서 제안한 방법을 이용하여 농축을 실시하였고, 그 비율은 각각 13.02%와 13.55%로서 최초 비율에 비해 약 113% 및 약 115% 증가함을 확인하였다.

<72> 이와 같은 농축 과정에서, 극소량으로 분포되어 있는 세포를 대상으로 본 특허에서 제시한 방법을 이용해서 농축을 실시한 경우, 포지티브는 약 110% 정도 그리고 네거티브의 경우 2 ~ 5%의 분리효율 증가를 확인하였다.

<73> 이 발명은 상기의 실시 예들에 한정되지 않으며, 특허청구범위에 기재되는 발명의 범위 내에서 다양한 변형이 가능하고, 이러한 변형도 이 발명의 범위 내에 포함된다.

【발명의 효과】

<74> 이상에서 상세하게 설명한 바와 같이, 이 발명의 세포혼합액 층에 자력을 인가하여 분리되는 세포의 분리 효율을 향상시키는 방법에 의하면, 상판부와 하판부 사이에 형성된 마그네틱 비드가 부착된 특정세포가 혼합되어 있는 세포혼합액 층의 상판부 측에서 자력을 인가하여 필요로 하는 세포를 분리한 상태에서, 필요로 하지 않는 세포들을 모두 제거하고 하판부에 수용액을 상황에 따라 적정량 주입 수용한 후 다시 형성시킨 혼합 수용액 층을 유지하면서 상판부와 하판부 사이의 이격 거리를 다수 회 반복 변화시켜 혼합 수용액 층을 균질화시키고 인가되는 자력에 의해 필요로 하는 세포를 농축시켜 분리 효율이 향상되는 효과가 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

하판부에 수용된 마그네틱 비드가 부착된 특정세포가 혼합되어 있는 세포혼합액을, 상기 하판부의 상부에 마주하면서 위치하는 상판부 사이에서 세포혼합액 층으로 형성시키는 단계와;

상기 단계에서 형성된 세포혼합액 층의 상기 상판부 측에서 자력을 인가하여 세포혼합액 층의 상판부 측으로 특정세포를 이동시키면서 중력에 의해 특정세포 이외의 나머지 세포들을 세포혼합액 층의 하판부 측으로 이동되어지게 하는 단계;

상기 단계에서 세포혼합액 층의 상판부 측과 하판부 측으로 이동된 특정세포와 특정세포 이외의 나머지 세포들을, 상기 상판부와 하판부를 서로 멀어지게 하여 상기 상판부와 하판부에 특정세포와 특정세포 이외의 나머지 세포들로 각각 분리시키는 단계;

상기 단계에서 분리된 하판부의 특정세포 이외의 나머지 세포들을 모두 제거하고 하판부에 수용액만을 주입 수용한 후 상판부와 사이에서 특정세포 혼합 수용액 층을 형성시키는 단계;

상기 단계에서 형성된 혼합 수용액 층을 유지하면서 상기 상판부와 하판부 사이의 이격 거리를 다수 회 반복 변화시켜 혼합 수용액 층을 균질화시키는 단계;

상기 단계에서 균질화된 혼합 수용액 층의 상판부 측에서 인가되는 자력에 의해 혼합 수용액 층의 상판부 측으로 특정세포를 이동시키면서 중력에 의해 특정

세포 이외의 나머지 세포들을 혼합 수용액 층의 하판부 측으로 이동되어지게 하는 단계; 및,

상기 단계에서 혼합 수용액 층의 상판부 측과 하판부 측으로 이동된 특정세포와 특정세포 이외의 나머지 세포들을 상기 상판부와 하판부를 서로 멀어지게 하여, 상기 상판부와 하판부에 특정세포와 특정세포 이외의 나머지 세포들로 각각 분리시키는 단계;로 이루어지는 것을 특징으로 하는 세포혼합액 층에 자력을 인가할 때 분리되는 세포의 분리 효율을 향상시키는 방법.

【청구항 2】

하판부에 수용된 마그네틱 비드가 부착된 특정세포가 혼합되어 있는 세포혼합액을, 상기 하판부의 상부에 마주하면서 위치하는 상판부 사이에서 세포혼합액 층으로 형성시키는 단계와;

상기 단계에서 형성된 세포혼합액 층의 상기 상판부 측에서 자력을 인가하여 세포혼합액 층의 상판부 측으로 특정세포를 이동시키면서 중력에 의해 특정세포 이외의 나머지 세포들을 세포혼합액 층의 하판부 측으로 이동되어지게 하는 단계;

상기 단계에서 세포혼합액 층의 상판부 측과 하판부 측으로 이동된 특정세포와 특정세포 이외의 나머지 세포들을, 상기 상판부와 하판부를 서로 멀어지게 하여 상기 상판부와 하판부에 특정세포와 특정세포 이외의 나머지 세포들로 각각 분리시키는 단계;

상기 단계에서 분리된 상판부의 특정세포를 모두 제거하고 상기 하판부에 수용액을 추가로 적정량 주입 수용한 후 상판부와 사이에서 특정세포 이외의 나머

지 세포 혼합 수용액 층을 형성시키는 단계;

상기 단계에서 형성된 혼합 수용액 층을 유지하면서 상기 상판부와 하판부 사이의 이격 거리를 다수 회 반복 변화시켜 혼합 수용액 층을 균질화시키는 단계;

상기 단계에서 균질화된 혼합 수용액 층의 상기 상판부 측에서 인가되는 자력에 의해 혼합 수용액 층의 상판부 측으로 특정세포를 이동시키면서 중력에 의해 특정세포 이외의 나머지 세포들을 혼합 수용액 층의 하판부 측으로 이동되어지게 하는 단계; 및,

상기 단계에서 혼합 수용액 층의 상판부 측과 하판부 측으로 이동된 특정세포와 특정세포 이외의 나머지 세포들을 상기 상판부와 하판부를 서로 멀어지게 하여, 상기 상판부와 하판부에 특정세포와 특정세포 이외의 나머지 세포들로 각각 분리시키는 단계;로 이루어지는 것을 특징으로 하는 세포혼합액 층에 자력을 인가할 때 분리되는 세포의 분리 효율을 향상시키는 방법.

【청구항 3】

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 균질화된 혼합 수용액 층을 이루는 상판부와 하판부 사이의 이격 거리를 조절하는 단계;를 상기 혼합 수용액 층을 균질화시키는 단계와, 상기 균질화된 혼합 수용액 층의 상기 상판부 측에서 인가되는 자력에 의해 혼합 수용액 층의 상판부 측으로 특정세포를 이동시키면서 중력에 의해 특정세포 이외의 나머지 세포들을 혼합 수용액 층의 하판부 측으로 이동되어지게 하는 단계 사이에 추가로 수행하는 것을 특징으로 하는 세포혼합액 층에 자력을 인가할 때 분리되는 세포의 분리

효율을 향상시키는 방법.

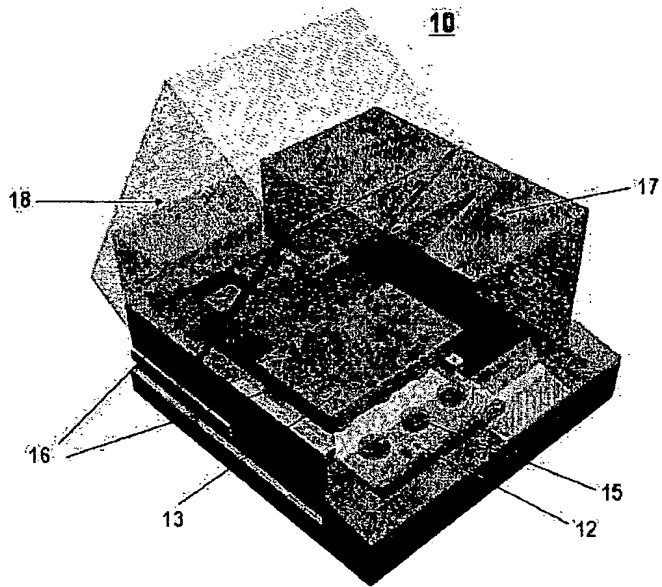
【청구항 4】

제 1항에 있어서,

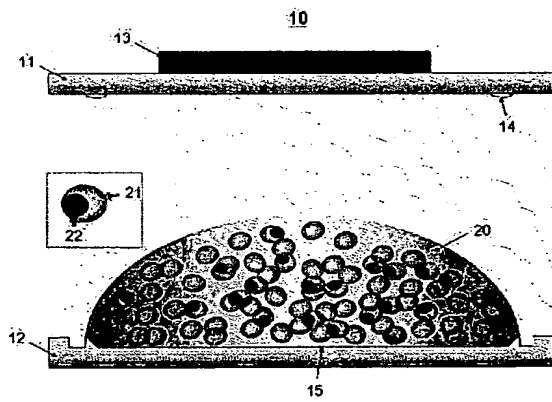
상기 특정세포 이외의 나머지 세포 혼합 수용액 층을 형성시키는 단계에서,
상기 하판부에 추가로 수용액을 적정량 주입 수용시키고 상기 세포 혼합 수용액 내
의 세포들이 충분히 가라앉은 상태가 되도록 일정 시간 동안 유지한 후 상기 특정
세포 이외의 나머지 세포 혼합 수용액 층을 형성시키는 단계;를 수행하는 것을 특
징으로 하는 세포혼합액 층에 자력을 인가할 때 분리되는 세포의 분리 효율을 향상
시키는 방법.

【도면】

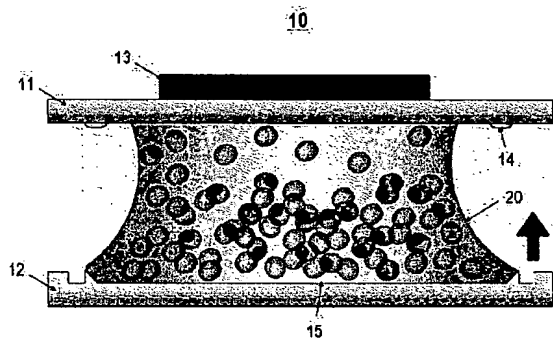
【도 1】



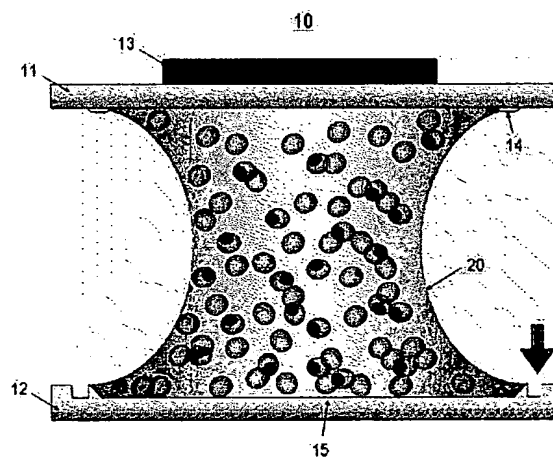
【도 2a】



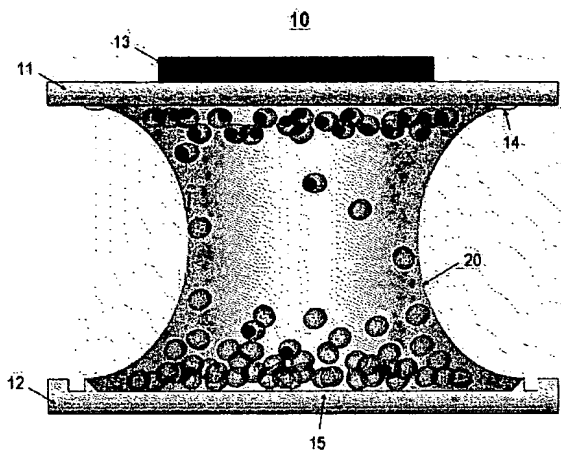
【도 2b】



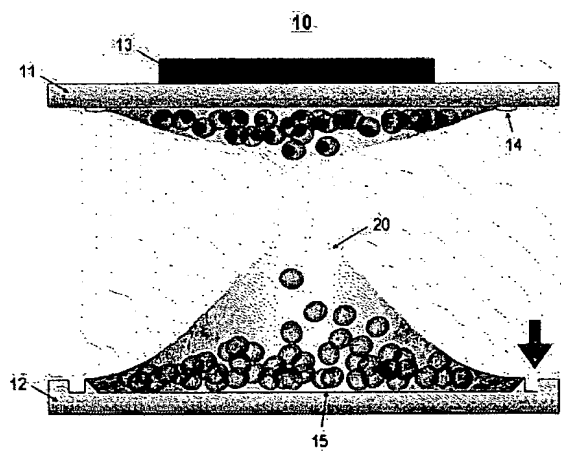
【도 2c】



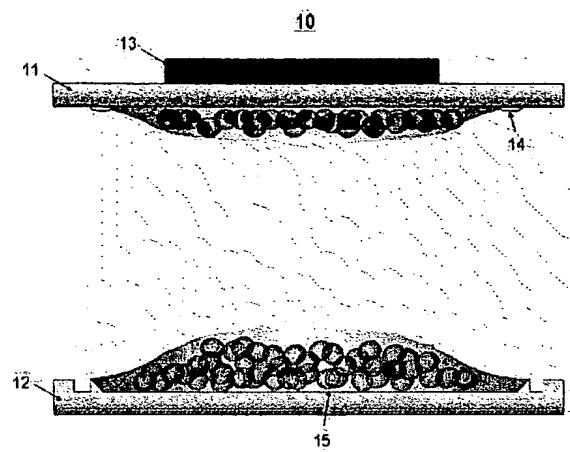
【図 2d】



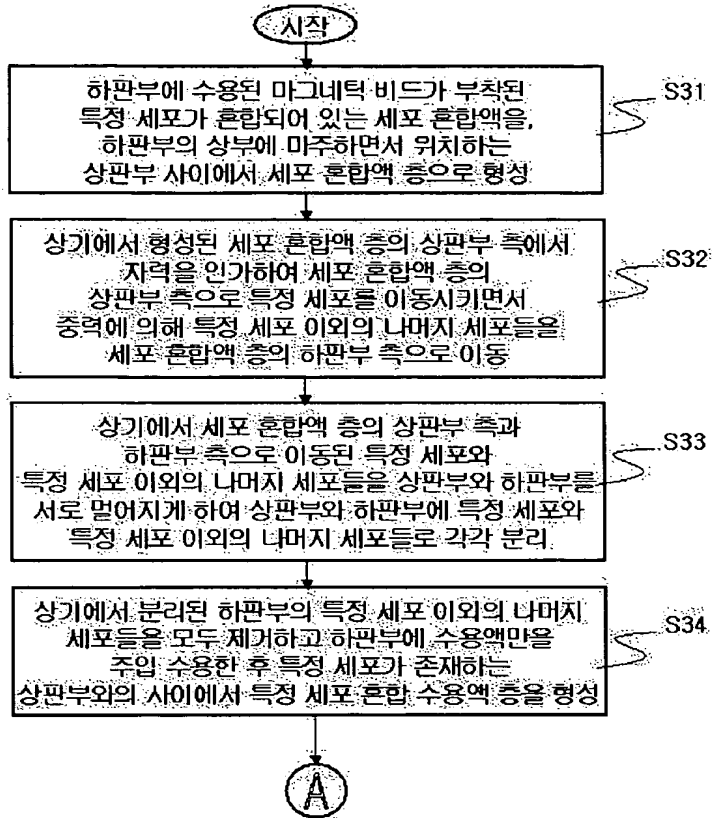
【図 2e】



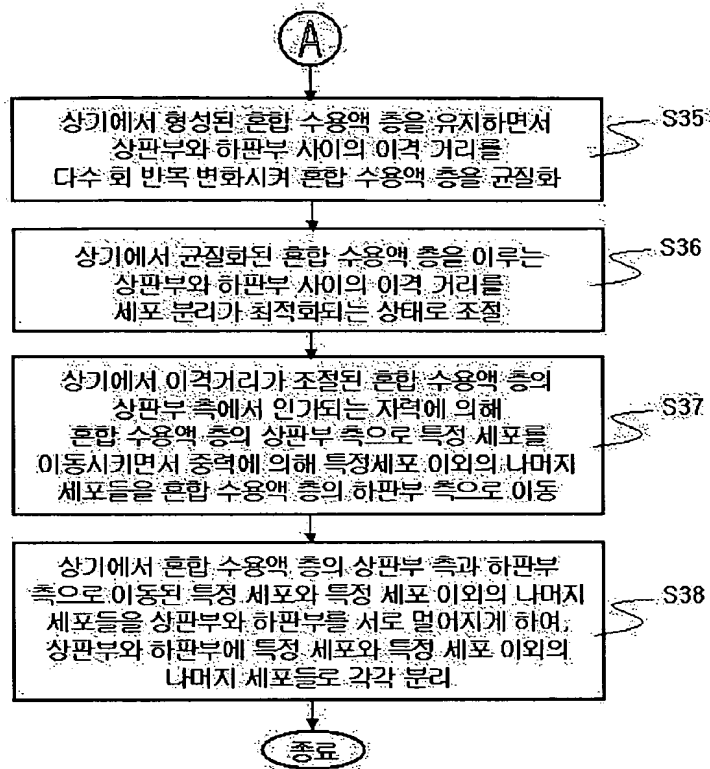
【도 2f】



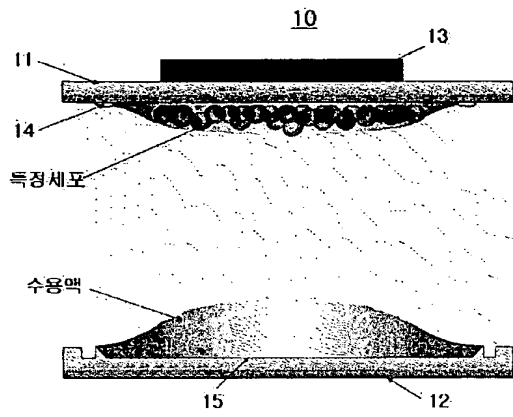
【도 3a】



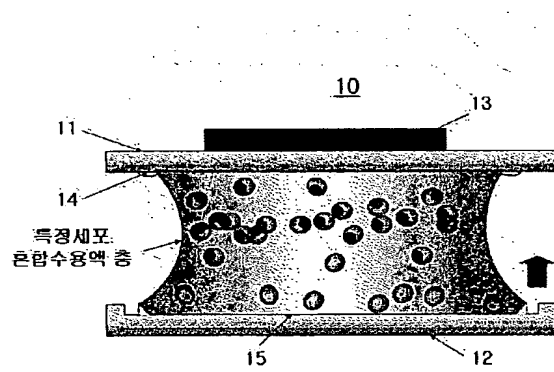
【도 3b】



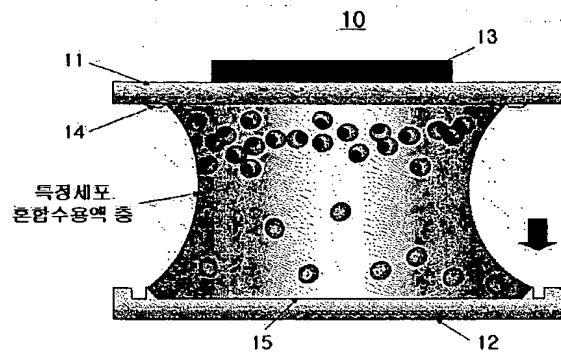
【도 4a】



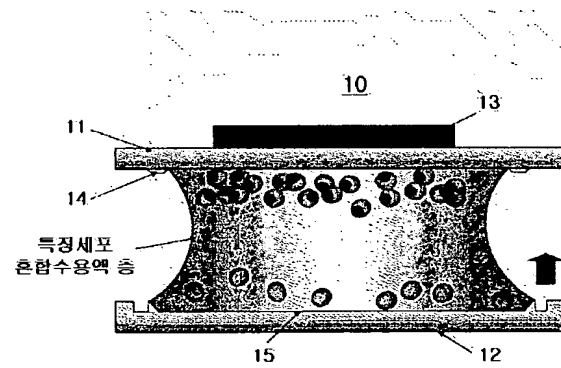
【도 4b】



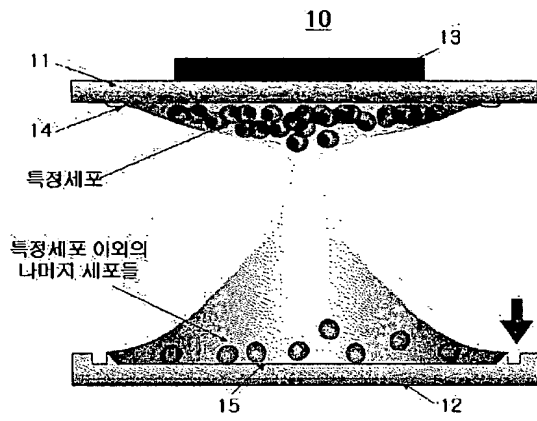
【도 4c】



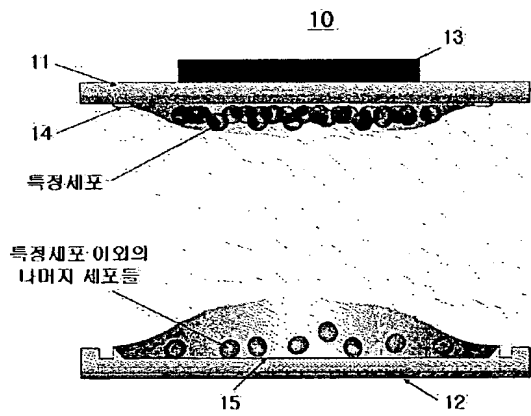
【도 4d】



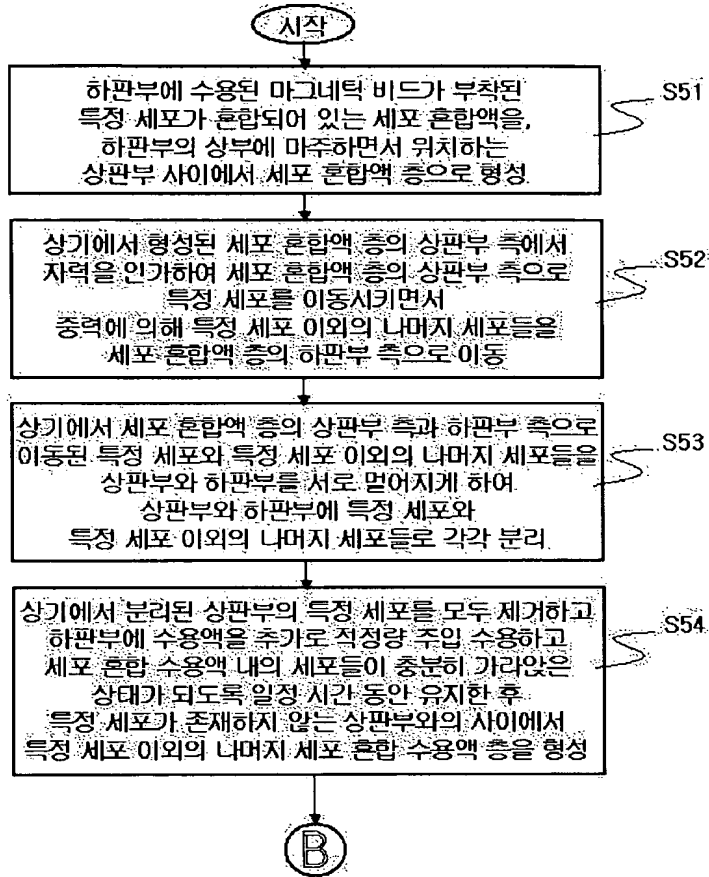
【도 4e】



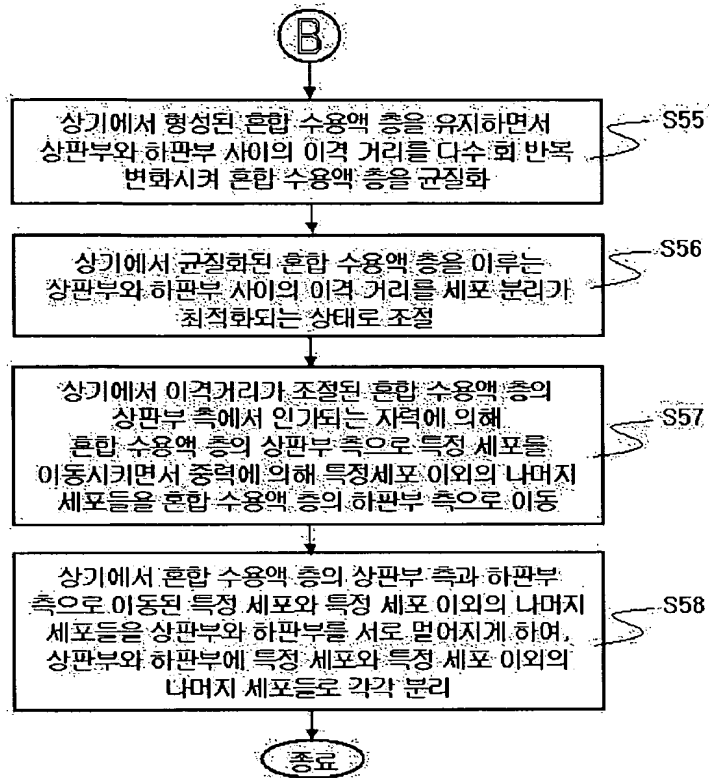
【도 4f】



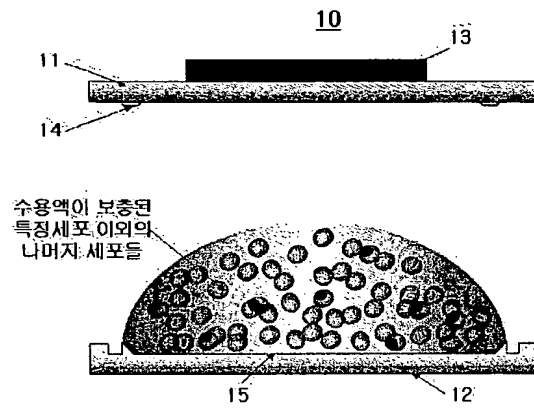
【도 5a】



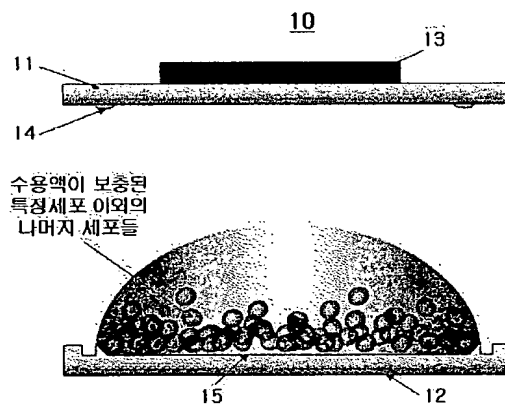
【도 5b】



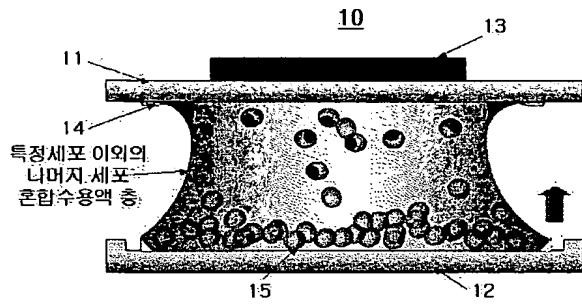
【도 6a】



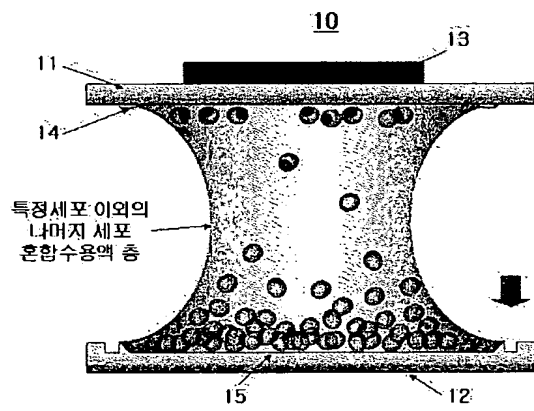
【도 6b】



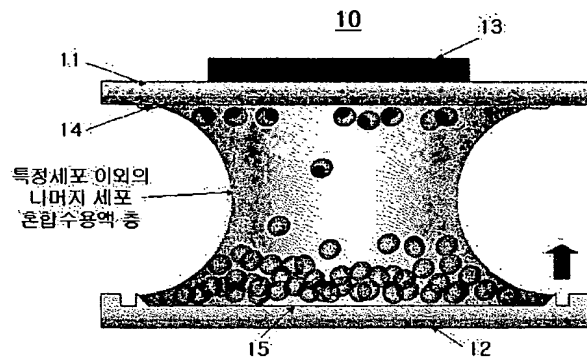
【도 6c】



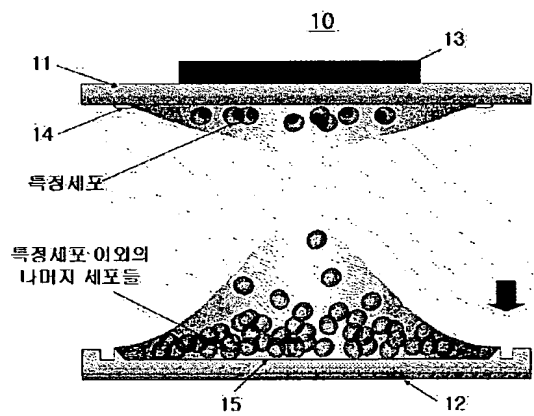
【도 6d】



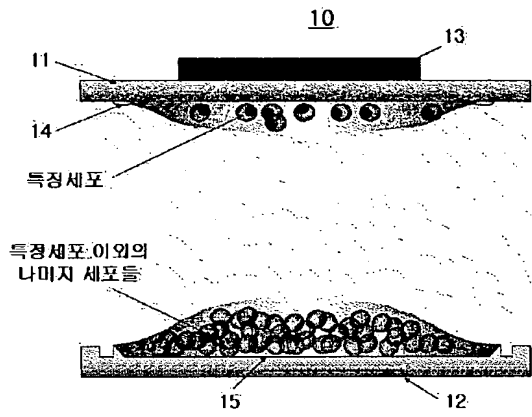
【도 6e】



【도 6f】



【도 6g】



Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR2006/001077

International filing date: 23 March 2006 (23.03.2006)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2005-0089607
Filing date: 27 September 2005 (27.09.2005)

Date of receipt at the International Bureau: 10 April 2006 (10.04.2006)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office

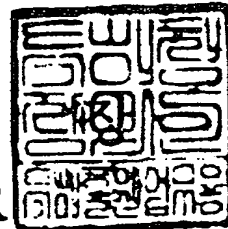
출 원 번 호 : 특허출원 2005년 제 0089607 호
Application Number 10-2005-0089607

출 원 일 자 : 2005년 09월 27일
Date of Application SEP 27, 2005

출 원 인 : 김영호
Applicant(s) kim young ho

2006 년 03 월 29 일

특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】 특허출원서
【권리구분】 특허
【수신처】 특허청장
【제출일자】 2005.09.27
【발명의 국문명칭】 세포혼합액 층에 자력을 인가하여 세포를 분리하는 장치 및 방법
【발명의 영문명칭】 Apparatus and method for separating cells from cell suspension layer by magnets
【출원인】
【성명】 김영호
【출원인코드】 4-2005-023434-1
【발명자】
【성명】 김영호
【출원인코드】 4-2005-023434-1
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다.

출원인

김영호 (인)

【수수료】

【기본출원료】	0 면	38,000 원
【가산출원료】	41 면	0 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	0 항	0 원
【합계】		38,000 원
【감면사유】	개인(70%감면)	
【감면후 수수료】		11,400 원

【요약서】

【요약】

이 발명은 마그네틱 비드가 부착된 특정세포가 혼합되어 있는 세포혼합액을 층 형태로 형성시키고, 여기서 형성된 세포혼합액 층의 상부에 자력을 인가하여 필요로 하는 세포를 안정적이고 효율 높게 대량으로 분리할 수 있는 장치 및 방법의 제공을 그 목적으로 한다.

상기의 목적을 달성하기 위해 이 발명의 세포혼합액 층에 자력을 인가하여 세포를 분리하는 장치는, 상판부와; 상기 상판부의 하부에 마주하면서 위치하며, 마그네틱 비드가 부착된 특정세포가 혼합되어 있는 세포혼합액을 수용하는 세포혼합액 수용부가 상측면에 구비되는 하판부; 상기 상판부의 상측면에 설치되는 자력 인가수단; 및, 상기 상판부에 결합되어, 상기 세포혼합액 수용부에 수용된 세포혼합액이 상기 상판부와 하판부 사이에서 층이 형성되게 상판부를 하판부에 가까워지도록 이동시키거나 또는 상기 자력 인가수단에서 인가되는 자력에 의해 상기에서 형성된 세포혼합액 층의 상판부 측으로 이동된 특정세포와 중력에 의해 세포혼합액 층의 하판부 측으로 이동되어지는 특정세포 이외의 나머지 세포들이 각각 분리되게 상판부를 하판부에서 멀어지도록 이동시키는 상판부 이동수단;을 포함하여 구성된다.

【대표도】

도 7e

【명세서】

【발명의 명칭】

세포혼합액 층에 자력을 인가하여 세포를 분리하는 장치 및 방법{Apparatus and method for separating cells from cell suspension layer by magnets}

【도면의 간단한 설명】

- <1> 도 1a 내지 도 1d는, 종래 마그네틱 비드가 결합된 특정세포가 혼합되어 있는 물방울 형태의 세포혼합액에 자력을 인가하여 필요로 하는 세포를 분리하는 과정을 개념적으로 도시한 것이고,
- <2> 도 2는, 이 발명의 실시 예에 따른 마그네틱 비드가 결합된 특정세포가 혼합되어 있는 세포혼합액 층에 자력을 인가하여 필요로 하는 세포를 분리하는 장치를 개략적으로 도시한 것이고,
- <3> 도 3 내지 도 6은, 도 2의 장치를 사용하여 세포혼합액으로부터 필요로 하는 세포를 분리하는 과정의 예들을 도시한 흐름도이고,
- <4> 도 7a 내지 도 7g는, 도 3 내지 도 6의 세포혼합액으로부터 필요로 하는 세포를 분리하는 과정을 개념적으로 도시한 것이다.
- <5> <도면의 주요 부분에 대한 부호의 설명>
- <6> 10 : 이 발명의 실시 예에 따른 세포 분리 장치
- <7> 11 : 상판부
12 : 하판부
- <8> 13 : 자석
14 : 세포혼합액 수용 경계 띠

- | | | |
|------|-----------------|----------------|
| <9> | 15 : 세포혼합액 수용 홈 | 16 : 상판부 이동 수단 |
| <10> | 17 : 하판부 이동 수단 | 18 : 제어부 |
| <11> | 19 : 챔버 | 20 : 세포혼합액 |
| <12> | 21 : 특정세포 | 22 : 마그네틱 비드 |

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<13> 이 발명은 세포를 분리하는 장치 및 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 마그네틱 비드(magnetic beads)가 부착된 특정세포가 혼합되어 있는 세포혼합액 층에 자력을 인가하여 필요로 하는 세포를 분리하는 장치 및 방법에 관한 것이다.

<14> 종래 마그네틱 비드가 부착된 특정세포가 혼합되어 있는 세포혼합액에 자력을 인가하여 특정세포만을 분리하기 위해 사용되어지고 있는 컬럼형 세포 분리 장치는, 그 내부에 페라이트로 이루어진 쇠구슬을 다량 구비하고, 여기에 항원 항체 반응을 이용하여 마그네틱 비드가 부착된 상태의 특정세포가 혼합된 세포혼합액을 중력 방향으로 투입하면서 자력을 인가함으로써, 상기 컬럼 내에 페라이트로 이루어진 다량의 쇠구슬들은 상자성체의 성질로 자화되어, 상기 특정세포들을 달라붙게 하고 상기 특정세포 이외의 나머지는 중력 방향으로 빠져나가게 하여 특정세포를 분리해 낸다.

<15> 그러나, 상기 컬럼형 세포 분리 장치를 사용하여 다양한 크기 혹은 양의 세

포를 분리하는 경우, 상기 쇄구슬들의 크기에 따라 생성되는 공극의 크기가 특정 세포의 분리를 방해할 수 있기 때문에 사용되어지는 쇄구슬들의 크기를 적절히 조절해 주어야만 한다.

<16> 또한, 상기에서 분리하고자 하는 특정세포들이 직접 쇄구슬들의 표면에 달라붙으면서 접촉에 의한 흡착이 발생할 수 있고, 세포 응집에 의한 공극의 막힘을 제거하기 위해 피펫을 이용하여 주기적으로 균질화시켜 주어야 하는 문제점도 있게 된다.

<17> 상기와 같은 문제점들을 해결하기 위해, 도 1a 내지 도 1d에 도시되어 있는 바와 같이, 마그네틱 비드가 부착된 특정세포가 포함되어 있는 세포혼합액을 물방울 형태의 세포혼합액으로 생성시키고, 여기에 자력을 인가하여 특정세포와 그 이외의 나머지 세포들로 구분 지은 후 버퍼 수용액만을 별도로 상기 물방울 형태의 세포혼합액에 추가 공급하여 특정세포이외의 나머지 세포들을 중력에 의해 완전히 분리시킨 상태에서 특정세포만을 채취하는, 종래 컬럼형 세포 분리 장치에 비해 쇄구슬과 같은 컬럼(column) 층 없이 간단한 구조와 공정의 단순화를 실현한, 물방울 형태의 세포혼합액을 이용한 세포 분리 방법이 본 발명자 등에 의해 제안되었다.

<18> 그러나, 상기 물방울 형태의 세포혼합액을 이용한 세포 분리 방법은, 상기 물방울 형태의 세포혼합액의 하부가 공기에 노출된 상태이므로 미세한 주변 공기의 흐름에도 내부의 특정세포 이외의 나머지 세포들이 요동을 치면서 외란이 발생하게 되며, 또한 도 1c에 도시되어 있는 바와 같이, 분리하고자 하는 특정세포 이외의

나머지 세포들을 제거하기 위해 버퍼 수용액만을 추가 주입하는 과정에서 하부에 있던 특정세포 이외의 나머지 세포들 중 일부가 다시 상부의 특정세포 쪽으로 이동하여 분리 효율이 현저히 낮아지는 문제점이 있게 된다.

<19> 더욱이, 상기 물방울 형태의 세포혼합액을 이용한 세포 분리 방법은, 분리 과정 중에 세포 혼합액이 놓인 용기를 인위적으로 회전시켜 물방울 형태를 생성 유지하면서 특정세포의 분리를 수행하므로 분리되어지는 양이 생성되는 물방울의 범위 내로 한정되어 대량의 세포를 분리하는 데는 한계가 있었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<20> 이와 같은 상기의 문제점들을 해결하기 위해 이 발명은, 마그네틱 비드가 부착된 특정세포가 혼합되어 있는 세포혼합액을 층 형태로 형성시키고, 여기서 형성된 세포혼합액 층의 상부에서 자력을 인가하여 필요로 하는 세포를 안정적이고 효율 높게 대량으로 분리할 수 있는 장치 및 방법의 제공을 그 목적으로 한다.

【발명의 구성】

<21> 상기의 목적을 달성하기 위해 이 발명의 세포혼합액 층에 자력을 인가하여 세포를 분리하는 장치는, 상판부와; 상기 상판부의 하부에 마주하면서 위치하며, 마그네틱 비드가 부착된 특정세포가 혼합되어 있는 세포혼합액을 수용하는 세포혼합액 수용부가 상측면에 구비되는 하판부; 상기 상판부의 상측면에 설치되는 자력 인가수단; 및, 상기 상판부에 결합되어, 상기 세포혼합액 수용부에 수용된 세포혼합액이 상기 상판부와 하판부 사이에서 층이 형성되게 상판부를 하판부에 가까워지도록 이동시키거나 또는 상기 자력 인가수단에서 인가되는 자력에 의해 상기에서

형성된 세포혼합액 층의 상판부 측으로 이동된 특정세포와 중력에 의해 세포혼합액 층의 하판부 측으로 이동되어지는 특정세포 이외의 나머지 세포들이 각각 분리되게 상판부를 하판부에서 멀어지도록 이동시키는 상판부 이동수단;을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포혼합액 층에 자력을 인가하여 세포를 분리하는 장치를 제공한다.

<22> 바람직하게는, 상기 상판부 이동수단이 상기 세포혼합액 층이 형성된 상판부와 하판부 사이의 이격 거리를 조절하여 세포의 분리를 최적화하는 상태로 유지되도록 상기 상판부를 이동시키게 하여도 좋다.

<23> 또한, 상기의 목적을 달성하기 위해 이 발명의 세포혼합액 층에 자력을 인가하여 세포를 분리하는 장치는, 마그네틱 비드가 부착된 특정세포가 혼합되어 있는 세포혼합액을 수용하는 세포 분리용 세포혼합액 수용 칩에 자력을 인가하여 필요로 하는 세포를 분리하는 장치에 있어서, 상기 세포 분리용 세포혼합액 수용 칩은, 상판부와, 상기 상판부의 하부에 마주하면서 위치하며, 상기 세포혼합액을 수용하는 세포혼합액 수용부가 상측면에 구비된 하판부로 이루어지고, 상기 세포혼합액이 층을 형성하도록 상기 상판부와 세포혼합액이 수용된 하판부가 가까워지게 하거나 또는 상기에서 형성된 세포혼합액 층의 상판부 측에서 인가되는 자력에 의해 상판부 측으로 이동된 특정세포와 중력에 의해 하판부 측으로 이동되어진 특정세포 이외의 나머지 세포들이 각각 분리되도록 상기 상판부와 하판부가 멀어지게 하는 것을 특징으로 하는 세포혼합액 층에 자력을 인가하여 세포를 분리하는 장치를 제공한다.

<24> 바람직하게는, 상기 상판부가 친수성 물질이고, 상기 세포혼합액 수용부에

· 대응하는 위치와 크기를 갖는 부분의 주위를 소수성 물질의 경계 띠로 둘러싸면서 경계를 형성시켜도 좋다.

<25> 바람직하게는, 상기 상판부가 소수성 물질이고, 상기 세포혼합액 수용부에 대응하는 위치와 크기를 갖는 부분을 친수성 물질로 코팅하여도 좋다.

<26> 바람직하게는, 상기 하판부가 친수성 물질이고, 상기 세포혼합액 수용부의 상기 세포혼합액이 수용되는 부분의 주위를 소수성 물질의 경계 띠로 둘러싸면서 경계를 형성시켜도 좋다.

<27> 바람직하게는, 상기 하판부가 친수성 물질이고, 상기 세포혼합액 수용부가 홈을 형성하게 하여도 좋다.

<28> 바람직하게는, 상기 하판부가 소수성 물질이고, 상기 세포혼합액 수용부를 친수성 물질로 코팅한 것이어도 좋다.

<29> 또한, 상기 목적을 달성하기 위해 이 발명의 세포혼합액 층에 자력을 인가하여 세포를 분리하는 방법은, 하판부에 수용된 마그네틱 비드가 부착된 특정세포가 혼합되어 있는 세포혼합액을, 상기 하판부의 상부에 마주하면서 위치하는 상판부 사이에서 세포혼합액 층으로 형성시키는 단계와; 상기 단계에서 형성된 세포혼합액 층의 상기 상판부 측에서 자력을 인가하여 세포혼합액 층의 상판부 측으로 특정세포를 이동시키면서 중력에 의해 특정세포 이외의 나머지 세포들도 세포혼합액 층의 하판부 측으로 이동되어지게 하는 단계; 및, 상기 단계에서 세포혼합액 층의 상판부 측으로 이동된 특정세포와 세포혼합액 층의 하판부 측으로 이동된 특정세포 이외의 나머지 세포들을, 상기 상판부와 하판부를 멀어지게 하여 상기의

세포혼합액 층이 없어지면서 각각 분리되게 하는 단계;로 이루어지는 것을 특징으로 하는 세포혼합액 층에 자력을 인가하여 세포를 분리하는 방법을 제공한다.

<30> 바람직하게는, 상기 하판부에 세포혼합액을 수용시킨 후 일정 시간 동안 유지하여 상기 세포혼합액 내의 세포들이 충분히 가라앉은 상태가 되게 하는 단계;를 상기 세포혼합액 층으로 형성시키는 단계 이전에 수행하게 하여도 좋다.

<31> 바람직하게는, 상기 상판부와 하판부 사이의 이격 거리를 조절하여 상기 세포혼합액 층의 폭이 세포 분리를 최적화시키는 상태로 유지되게 하는 단계;를 상기 세포혼합액 층으로 형성시키는 단계와 상기 세포혼합액 층의 상판부 측과 하판부 측으로 특정세포와 특정세포 이외의 나머지 세포들이 각각 이동되는 단계 사이에서 수행하게 하여도 좋다.

<32> 이하에서, 이 발명의 실시 예에 따른 층 형태의 마그네틱 비드가 부착된 특정세포가 혼합된 세포혼합액에 자력을 인가하여 필요로 하는 세포를 분리하는 장치 및 방법에 대해 첨부된 도면을 참조하여 상세하게 설명하면 다음과 같다.

<33> 도 2는, 이 발명의 실시 예에 따른 마그네틱 비드가 결합된 특정세포가 혼합되어 있는 세포혼합액 층에 자력을 인가하여 필요로 하는 세포를 분리하는 장치를 개략적으로 도시한 것이다.

<34> 이 발명의 실시 예에 따른 세포 분리 장치(10)는, 상판부(11)와 하판부(12), 상판부(11)의 상측면에 설치되는 자석(13) 및 상판부 이동 수단(16)과 하판부 이동 수단(17)이 내부에 위치하는, 개폐 가능한 챔버(19)와, 상기 챔버(19) 내의 상판부(11)와 하판부(12) 사이에 형성되는 세포혼합액 층의 온도를 대략 4℃ 정

도로 유지하고, 습도 및 O_2 , CO_2 와 같은 생체 가스의 유입을 조절하여 상기 세포가 생존하는데 최적의 환경을 유지시키도록 하는 한편, 이 발명의 실시 예에 따른 세포 분리 장치(10)를 자동으로 작동시키게 하는 경우에는 상기 상판부 이동 수단(16)과 하판부 이동 수단(17)을 제어하도록 연결부를 포함하여 상기 챔버(19)의 일측에 설치되는 제어부(18) 및, 이외에도 하부에 상기 제어부(18)의 제어 상태를 조작할 수 있게 설치되는 제어 패널이나 전면에 현재 작동 상태를 외부에 표시하기 위해 설치된 디스플레이 등으로 이루어진다.

<35> 이 발명의 실시 예에 따른 세포 분리 장치(10)에서, 상기 상판부(11)와 하판부(12)가 서로 마주한 상태로 이루어지는 세포 분리용 세포 혼합액 수용 칩의 내부에 세포혼합액 층을 형성시켜 필요로 하는 세포를 분리하게 한다.

<36> 상기 상판부(11)는, 자력을 인가하기 위한 자석(13)이 상측면에 설치되는데, 상기 자석(13)은 영구자석이나 전자석 또는 외부 자력 인가에 의해 자성을 띌 수 있는 자성체 등으로 필요에 따라 선택되어질 수 있다.

<37> 또한, 상기 상판부(11)는 마그네틱 비드가 부착된 특정세포가 혼합되어 있는 세포혼합액(20)이 층을 형성하면서 흡착되는 부분을 하측면에 특정시켜 형성할 수 있다.

<38> 이 경우, 상기 상판부(11)의 세포혼합액(20)이 층을 형성하면서 흡착되는 부분은, 상기 세포혼합액(20)이 외부로 흘러나가지 않고 그 내부에 수용되도록 하기 위해, 상기 상판부(11)가 친수성 물질이면 상기 세포혼합액(20)이 흡착되는 주위를 둘러싸면서 경계를 형성하는 소수성 물질의 세포혼합액 수용 경계 띠(14)를

구비하고, 상기 상판부(11)가 소수성 물질이면 해당 부분을 친수성 물질로 코팅하여 형성되는 수용 면을 구비한다.

<39> 상기 하판부(12)는, 상기 상판부(11)와 세포혼합액이 층을 형성하거나 또는 층을 형성한 세포혼합액을 분리하는데 어려움이 없는 정도의 충분한 여유를 두고 하부에 위치하며, 상측면에 상기 세포혼합액(20)을 수용하는 세포혼합액 수용부(15)를 구비한다.

<40> 상기 세포혼합액 수용부(15)는, 상기 세포혼합액(20)이 주입 수용되는 부분으로 상기 세포혼합액(20)을 수용하는데 있어서 흡착 면적을 최대로 하여 흡착력을 극대화하기 위해 수직 벽면을 내부로 가면서 경사지게 홈의 형태로 형성시킬 수 있다.

<41> 이 경우, 상기 홈은 상기 하판부(12)가 친수성 물질이면 상기 홈의 외부로 세포혼합액(20)이 흘러나가지 않으므로 별다른 처리가 없어도 되지만, 상기 하판부(12)가 소수성 물질이면 상기 홈의 내부를 친수성 물질로 코팅하여 세포혼합액(20)이 잘 흡착되도록 한다.

<42> 여기서, 세포혼합액 층을 형성하는데 있어 상부층과 하부층의 크기를 결정하는 상기 상판부(11)의 세포혼합액이 흡착되는 부분과 상기 하판부(12)의 세포혼합액 수용부(15)의 크기에 따라 분리하고자 하는 세포의 양을 결정할 수 있게되며, 종래 물방울 형태의 세포 분리 장치에서 물방울의 특성상 소량의 세포 분리만이 가능했던 것과는 달리, 대량의 세포 분리가 가능하게 되는 것으로 이 발명의 특징 중 하나로 된다.

- <43> 또한, 상기 하판부(12)의 세포혼합액 수용부(15)의 크기뿐만 아니라 다수 개 형성시키는 경우에는 한 번에 보다 많은 양의 세포 분리도 가능하게 된다.
- <44> 상기 상판부 이동수단(16)은, 상기 상판부(11)의 일 측단이나 양 측단 또는 상측면에 결합되어, 상기 상판부(11)를 상기 하판부(12)에 가까워지게 하부로 이동시키거나 또는 하판부(12)에서 멀어지게 상부로 이동시킨다.
- <45> 이러한 상기 상판부 이동수단(16)은, 수동으로 상기 상판부(11)를 상하로 이동시키면서 세포혼합액 층을 최적으로 형성하거나 또는 형성된 세포혼합액 층을 없어지게 한다.
- <46> 그런데, 사용 형태에 따라 자동으로 상기 상판부(11)를 상하로 이동시키는 경우에 상기 상판부 이동 수단(16)은, 상기 세포혼합액 수용부(15)에 수용된 세포 혼합액(20)이 상기 상판부(11)와 하판부(12) 사이에서 층이 형성되도록 상기 상판부(11)를 이동시켜 하판부(12)에 다가가게 상기 제어부(18)에서 제어되는 한편, 필요로 하는 세포의 분리가 최적화되도록 상기 상판부(11)를 이동시켜 상기 세포혼합액 층이 형성된 상기 상판부(11)와 하판부(12) 사이의 이격 거리를 조절하게 상기 제어부(18)에서 제어된다.
- <47> 또한, 사용 형태에 따라 자동으로 상기 상판부(11)를 상하로 이동시키는 경우에 상기 상판부 이동 수단(16)은, 상기에서 형성된 세포혼합액 층의 상기 상판부(11) 측에서 자력을 인가하여 세포혼합액 층의 상판부(11) 측으로 이동된 특정세포와 세포혼합액 층의 하판부(12) 측으로 이동된 특정세포 이외의 나머지 세포들을 세포혼합액 층이 없어지면서 각각 분리되도록 상기 상판부(11)를 상부로 이동시켜

다시 하판부(11)에서 멀어지게 상기 제어부(18)에서 제어된다.

<48> 상기 하판부 이동수단(17)은, 상측면에 세포혼합액 수용부(15)를 구비한 상기 하판부(11)의 일 측단이나 양 측단 또는 하측면에 결합되어, 상기 상판부(11)의 하부에 마주하면서 위치하는 상기 하판부(12)를 사용자가 위치하고 있는 전방 측으로 이탈되게 이동시키거나 또는 이탈된 하판부(12)를 다시 상판부(11)와 서로 마주하게 후방 측으로 이동시킨다.

<49> 이러한 상기 하판부 이동수단(17)은, 수동으로 상기 하판부(12)를 전후방 측으로 이동시키면서 상기 세포혼합액 수용부(15)에 세포혼합액을 수용시키도록 하거나 또는 분리가 완료된 특정 세포 이외의 나머지 세포들이 채워질 수 있게 하는 한편, 세포혼합액 수용부(15)에 수용된 세포혼합액이 상기 상판부(11)와 서로 마주하게 한다.

<50> 그런데, 사용 형태에 따라 자동으로 상기 하판부(12)를 상하로 이동시키는 경우에 상기 하판부 이동 수단(17)은, 상기 세포혼합액 수용부(15)에 분리될 세포혼합액(20)을 주입 수용하거나 또는 분리가 완료된 특정세포 이외의 나머지 세포들이 채워질 수 있도록 상기 상판부(11)와 서로 마주하는 상기 하판부(12)를 전방 측으로 이동시키게 상기 제어부(18)에서 제어되는 한편, 전방 측으로 이동된 상태의 세포혼합액 수용부(15)에 수용된 세포혼합액의 분리를 위해 상판부(11)와 서로 마주하도록 상기 하판부(12)를 후방 측으로 이동시키게 상기 제어부(18)에서 제어된다.

<51> 즉, 이 발명의 실시 예에 따른 세포 분리 장치(10)에서는, 먼저 상기 하판

부 이동 수단(17)을 통해 상기 하판부(12)를 프론트 로딩 방식으로 사용자가 위치하고 있는 전방 측으로 꺼낸 상태에서 상기 세포혼합액 수용부(15)에 세포혼합액(20)을 주입 수용한 후, 주입 수용된 세포혼합액(20)으로부터 필요로 하는 세포를 분리시키기 위해 다시 후방 측으로 상기 하판부(12)를 넣어 상기 상판부(11)와 서로 마주하게 위치시킨다.

<32> 다음으로, 상기 상판부 이동 수단(16)을 통해 상판부(11)를 하판부(12)로 가까워지게 이동시켜 세포혼합액 층을 형성시키고, 형성된 세포혼합액 층의 상판부(11) 측에서 자력을 인가하여 특정세포와 특정세포이외의 나머지 세포들을 각각 상판부(11)와 하판부(12) 측으로 이동시킨 상태에서 다시 상판부(11)를 하판부(12)와 멀어지게 이동시켜 분리한다.

<33> 다음으로, 상기 하판부 이동 수단(17)을 통해 특정세포 이외의 나머지 세포들이 분리되어 남아있는 하판부(12)를 사용자가 위치하고 있는 전방 측으로 꺼내어 상기 하판부 이동 수단(17)으로부터 분리시켜 특정세포 이외의 나머지 세포들을 채취하게 된다. 또한, 상기 상판부(11)는 상기 상판부 이동 수단(16)으로부터 분리시켜 특정세포를 채취하게 된다.

<34> 따라서, 이 경우 하판부(12)를 전후방 측으로 이동시키고 상판부(11)를 상하로 이동시키도록 하는 메커니즘으로 구성이 간단하면서 고장도 적은 세포 분리 장치를 제조할 수 있게 된다.

<35> 상기와 같은 구성을 갖는 이 발명의 실시 예에 따른 세포 분리 장치(10)를 사용하여 필요로 하는 세포를 분리하는 과정을 첨부하는 도면을 참조하여 설명하면

다음과 같다.

<56> 도 3 내지 도 6은, 도 2의 장치(10)를 사용하여 세포혼합액으로부터 필요로 하는 세포를 분리하는 과정의 예들을 도시한 흐름도로서, 도 3은 이 발명의 실시 예에 따른 세포 분리 방법의 기본적인 과정을 도시한 것으로, 상기 하판부(12)에 마그네틱 비드가 부착된 특정세포가 혼합되어 있는 세포 혼합액을, 상기 하판부의 상부에 서로 마주하면서 위치하는 상판부(11) 사이에서 세포 혼합액 층으로 형성하고(S31), 상기 단계 S31에서 형성된 세포 혼합액 층의 상판부(11) 측에서 자력을 인가하여 세포 혼합액 층의 상판부(11) 측으로 특정세포를 이동시키면서 중력에 의해 특정세포 이외의 나머지 세포들도 세포 혼합액 층의 하판부(12) 측으로 이동시킨 후(S32), 상기 단계 S32에서 세포 혼합액 층의 상판부(11) 측과 하판부(12) 측으로 이동된 특정세포와 특정세포 이외의 나머지 세포들을, 상판부(11)와 하판부를 서로 멀어지게 하여 상판부(11)와 하판부(12)에 상기 세포 혼합액 층을 특정세포와 특정세포 이외의 나머지 세포들로 각각 분리시키도록 한다.(S33)

<57> 상기 단계 S31의 세포혼합액 층을 형성시키는 과정에서 세포혼합액 수용부(15)에 세포혼합액을 주입 수용시킨 후 바로 세포혼합액 층을 형성시키는 경우에는, 세포혼합액 내에 세포들이 중력에 의해 모두 가라 앉기 전에 상판부(11)와 흡착하는 순간 상판부(11)의 하측면에 특정세포 이외의 나머지 세포들도 달라붙을 수 있어 세포 분리 효율이 저하되게 된다.

<58> 이로부터, 도 4에서는 도 3의 단계 S31에서 세포혼합액 층을 형성시키는 과정에서, 상기 하판부(12)에 세포혼합액을 수용시키고 상기 세포혼합액 내의 세포들

을 충분히 가라앉은 상태로 되게 대략 1-2분 동안 유지시킨 후(S41), 상기 하판부(12)와 상판부(11) 사이에서 세포혼합액 층으로 형성하게 하여(S42), 분리 효율이 저하되는 것을 현저히 낮출 수 있도록 한다.

<59> 또한, 상기 도 3의 단계 S31에서 형성된 세포혼합액 층의 폭을, 필요로 하는 세포를 분리하는 모든 경우에 일정하게 유지하는 것이 오히려 효율적이지 못한 경우가 있게된다.

<60> 이로부터, 도 5에서는 도 3의 단계 S31에서 세포혼합액 층이 형성된 상판부(11)와 하판부(12)의 이격 거리를 조절하여 세포 분리를 최적화시키는 상태로 세포혼합액 층을 유지되도록 한다.(S52)

<61> 한편, 도 6에서는, 세포 분리 효율 저하를 방지하는 도 4의 단계 S42와 세포 분리의 최적화 상태를 유지하는 도 5의 단계 S52를 도 3의 세포 분리 과정에 모두 적용하여, 상기에서 설명한 세포 분리의 효율 저하와 분리의 최적화를 모두 실현할 수 있도록 한다.

<62> 도 7a 내지 도 7g는, 도 3 내지 도 6의 세포혼합액으로부터 필요로 하는 세포를 분리하는 과정을 개념적으로 도시한 것이다.

<63> 여기서, 상기 상판부(11)와 하판부(12)의 세포혼합액(20)이 층을 형성하면서 흡착되는 부분은, 상기 상판부(11)가 생체 적합성 물질로서 예를 들면 폴리메틸메타크릴레이트(PMMA, polymethylmethacrylate), 폴리프로필렌 또는 폴리아미드와 같은 친수성 물질이고, 또한 생체 적합성 물질 중에 하나인 폴리다이메틸실로세인(PDMS, polydimethylSiloxane)과 같은 소수성 물질의 세포혼합액 수용 경계 띠(1

4)로 상기 세포혼합액(20)이 흡착되는 주위를 둘러싸면서 경계를 형성시키는 한편, 상기 하판부(12)는 상기 상판부(11)와 같은 친수성 물질인 것으로 한다.

<64> 먼저, 도 7a에 도시되어 있는 바와 같이, 수동인 경우 직접 또는 자동인 경우 상기 제어부(18)의 제어에 의해, 상기 하판부 이동 수단(16)이 이동하면서 상기 상판부(11)와 세포혼합액이 층을 형성하거나 또는 층을 형성한 세포혼합액을 분리하는데 어려움이 없는 정도의 충분한 여유를 두는 예를 들면 30mm 정도의 거리를 두고 하부에 위치하는 상기 하판부(12)를 사용자가 위치하는 전방 측으로 꺼낸 상태에서 상기 세포혼합액 수용부(15)에 분리하고자 하는 마그네틱 비드(22)가 부착된 특정세포(21)가 포함된 세포혼합액(20)을 예를 들면 세포혼합액 수용부(15)의 직경이 5mm 인 경우 100 μ l 정도의 세포혼합액을 주입 수용한 후, 주입 수용된 세포혼합액(20)으로부터 필요로 하는 세포를 분리시키기 위해 상기 상판부(11)와 서로 마주하게 상기 하판부(12)를 후방 측으로 넣는다.

<65> 이 경우, 상기 세포혼합액 수용부(15)의 수직 벽면은 내부로 경사지면서 향하도록 하여 흡착 면적을 최대한 함으로써 흡착력의 극대화로 인한 보다 많은 양의 세포혼합액(20) 수용 및 적절한 분리를 가능하게 한다.

<66> 다음으로, 도 7b에 도시되어 있는 바와 같이, 상기 하판부(12)의 세포혼합액 수용부(15)에 수용된 세포혼합액 내의 세포들이 중력에 의해 모두 가라앉은 상태로 되게 일정 시간, 여기서는 대략 1-2분 정도 유지시켜 세포 분리 효율이 저하되는 것을 방지하게 된다.

<67> 다음으로, 도 7c에 도시되어 있는 바와 같이, 수동인 경우 직접 또는 자동

인 경우 상기 제어부(18)의 제어에 의해, 상기 상판부 이동 수단(16)이 이동하면서 상기 상판부(12)를 하부로 이동시켜, 상기 하판부 이동 수단(17)을 통해 상판부(11)와 서로 마주하게 위치시킨 하판부(12)의 상기 세포혼합액 수용부(15) 내에 주입 수용되어 있는 세포혼합액(20)이 상기 상판부(11)의 하측면에 흡착되면서 세포혼합액 층을 형성시킨다.

<68> 이 경우, 상기 상판부(11)가 친수성 물질이므로 소수성 물질인 세포혼합액 수용 경계 띠(14)의 내부에 세포혼합액(20)이 흡착되면서 세포혼합액 층을 형성시키게 된다.

<69> 다음으로, 도 7d에 도시되어 있는 바와 같이, 수동인 경우 직접 또는 자동인 경우 상기 제어부(18)의 제어에 의해, 상기 상판부 이동 수단(16)이 이동하면서 상판부(11)를 상부(도시되지 않았지만 경우에 따라 하부로도 이동)로 이동시켜 상기 세포혼합액 층이 형성된 상기 상판부(11)와 하판부(12) 사이의 이격 거리를 조절하여 특정세포의 분리가 최적화되는 상태를 유지한다.

<70> 일반적으로, 특정세포의 분리는 조절되는 세포혼합액 층의 상하 폭을, 즉 상판부(11)와 하판부(12)의 이격 거리를 크게 할수록 특정세포에 가해지는 자력과 특정세포 이외의 나머지에 가해지는 중력에 의해 확실하게 할 수 있다.

<71> 그러나, 세포혼합액 층이 형성되고 난 후 다음과 같은 이유에 의해 상판부(11)와 하판부(12)의 이격 거리를 조절하게 된다.

<72> 1) 제조사마다 다른 마그네틱 비드의 성질(크기, 밀도, 자화 정도)을 모두 수용할 수 있는 호환성(범용성 확보)을 갖게 하기 위함이다.

<73> 2) 분리하고자 하는 특정세포 자체의 특성에 적절하게 대처하기 위함이다.

분리하고자 하는 세포혼합액은 채취된 세포에 따라 특정세포의 함유 정도(세포 농도)가 다르다. 예를 들면, "CD45" 라는 항체를 가지는 세포는 80% 이상이 분리하고자 하는 특정세포로 세포혼합액에 포함되어 있고, "Ter119" 라는 항체를 가지는 세포는 15% 이상이 분리하고자 하는 특정세포로 세포혼합액에 포함되어 있으며, "Sca1" 이나 기타 줄기 세포 항체를 가지는 세포는 1% ~ 0.1% 미만이 분리하고자 하는 특정세포로 세포혼합액에 포함되어 있다.

<74> 즉, 어떠한 세포를 분리하고자 하는가에 따라 특성이 고려되어야 하는데, 0.1% 미만인 경우에 보통과 같은 높이를 유지하면 분리하고자 하는 특정세포의 표면에 마그네틱 비드가 미약하게 붙어 있을 경우에는 자력을 인가하여도 세포혼합액 층의 상판부(11) 층으로 올라오지 않을 수 있어 상기 상판부(11)와 하판부(12)를 더 가깝게 위치시켜 자력이 더 강하게 인가되도록 조정해 주는 것이다.

<75> 3) 특정세포가 혼합된 세포혼합액에는 특정세포 이외에 세포들의 살아있는 상태를 유지시키기 위해 세포혼합액(20)에 영양 물질(nutrient) 성분이 첨가되는데, 이러한 물질들에 의해 점성(Viscosity) 정도가 결정되므로 분리에 사용될 세포에 따라 그 점성도가 조금씩 차이가 있을 수 있고, 그렇게 되면 흡착 성질을 이용하여 상판부(11)와 하판부(12)에 층이 만들어지는 특성이 조금 차이가 있을 수 있으므로 그러한 미세적 차이도 반영하기 위함이다.

<76> 4) 사용되어지는 세포 분리용 칩으로 상판부(11)와 하판부(12)의 재질이 친수성(hydrophilic)인가 아니면 소수성(hydrophobic)인가에 따라 흡착 정도가 달라

지는 것을 조절하기 위함이다. 즉, 친수성 재질이면 세포혼합액(20)이 친수성에 가까울수록 흡착력이 서로 상응하게 작용하여 흡착 상태가 강하게 작용하지만, 소수성 재질에 가까워질수록 물과 기름이 서로 밀어내듯이, 소수성 칩과 친수성 세포 혼합액은 흡착 상태가 약해지게 된다.

<77> 5) 분리 환경이 건조할 경우 세포혼합액 자체에 수분 증발을 야기하게 되고, 그로 인해 그 용액의 점성도에 차이가 발생할 수 있어 이를 조절해 주기 위함이다. 즉, 이격 거리가 길면 공기와 접해지는 세포혼합액의 노출면이 넓어져 증발 속도가 빨라지므로 가능하면 이격 거리가 작을 수록 좋다고 할 수 있다.

<78> 다음으로, 도 7e에 도시되어 있는 바와 같이, 상판부(11)와 하판부(12)의 이격 거리가 최적으로 조절된 상태의 세포혼합액 층에 상기 자석(13)에서 자력이 인가되면서 상기 마그네틱 비드(22)가 부착된 특정세포(21)를 상판부(11) 측으로 이동시킨다.

<79> 즉, 상기 특정세포(21)에 인력을 가해 특정세포(21)가 세포혼합액 층의 내부에서 상기 상판부(11) 측으로 이동하게 되고, 이와 함께 특정세포 이외의 나머지 세포들은 중력에 의해 상기 세포혼합액 층의 내부에서 하판부(12) 측으로 이동하게 됨으로써 세포혼합액 층의 내부에서 분리가 일어난다.

<80> 이 경우, 상기 세포혼합액 층에 인가되는 자력의 세기는 상기 마그네틱 비드가 결합되어 있는 특정세포에 작용하는 중력의 크기를 극복할 수 있을 정도 이상의 크기이다.

<81> 다음으로, 도 7f에 도시되어 있는 바와 같이, 수동인 경우 직접 또는 자동

인 경우 상기 제어부(18)의 제어에 의해, 상기 상판부(11)와 하판부(12) 사이에 형성된 세포혼합액 층의 내부에서 상판부(11) 측으로 이동된 특정세포와 하판부(12) 측으로 이동된 특정세포 이외의 나머지 세포들을 완전히 분리되게 상판부(11)가 다시 하판부(12)에서 멀어지도록 상기 상판부 이동 수단(16)을 이동시킨다.

<82> 그러면, 도 7g에 도시되어 있는 바와 같이, 상판부(11)와 하판부(12)에는 각각 특정세포와 특정세포 이외의 나머지 세포들로 각각 분리되어지므로, 이후 필요로 하는 세포들을 채취하여 이용하게 된다.

<83> 또한, 상기 제어부(18)의 제어에 의해, 상기 챔버(19) 내부의 세포혼합액 층의 온도를 4℃로 유지하고, 습도 및 O₂, CO₂ 와 같은 생체 가스의 유입을 조절하여 상기 세포가 생존하는데 최적의 환경을 유지시키도록 한다.

<84> 상기와 같은 이 발명의 실시 예에 따른 세포혼합액으로부터 필요로 하는 세포를 분리하는 과정을, 컬럼형 세포분리기와 비교하면서 실험한 내용을 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

<85> 1. 골수세포 준비(Preparation of bone marrow cells(BMCs))

<86> 무균 상태에서 성체ICR 마우스로 부터 대퇴부(femurs)와 경골(tibias)을 제거한 뒤, 26G의 주사 바늘이 결합된 주사기를 이용하여 골수강(Marrow cavities)에 0.5% BSA가 함유된 PBS(phosphate-buffered saline, pH 7.4)/BSA 용액을 플러싱(flushing) 한다.

<87> 플러싱에 의해 얻어진 세포 혼합액(cell suspension)을 수 차례 파이펫팅(Pipetting)하여 단일 세포 혼합액(Single cell suspension : 세포들이 하나하나

날알 상태로 존재하게 함) 상태로 만들어 준 뒤, 나일론 메쉬(nylon mesh)를 사용하여 영커 있는 덩어리들(particulates)을 제거한다.

<88> 그 후, PBS/BSA 용액으로 2~3회 세척해 준 뒤, 헤모사이토미터 (hemocytometer : 세포 카운터)로 세포의 수를 측정한 후 10^7 cells/ml의 상태로 만들어 준다.

<89> 2. 마그네틱 비드 레이블링(Immunomagnetic labeling of Sca1(+) cells)

<90> 상기 1.의 준비 과정을 통해 얻어진 세포 혼합액을 biotinylated anti-Sca1 antibody solution(Pharminen, San Diego, CA, 1:500)에 10분간 인큐베이션 (incubation) 시킨다.

<91> PBS/BSA 용액으로 2~3회 세척한 뒤, 동일한 용액으로 $80\mu\text{l}$ 의 세포 혼합액을 만들고 $20\mu\text{l}$ 의 streptavidin conjugated microbead 용액(Miltenyi Biotec, Inc. Bergisch Gladbach, Germany)과 혼합하여 4°C 에서 15 분간 방치한다.

<92> Flow cytometry를 이용하여 세포들의 레이블링 상태를 확인하기 위해 Streptavidin-PE-Texas RED (Pharminen, San Diego, CA, 1:500)와 혼합하여 4°C 에서 15 분간 방치한 후, PBS/BSA 용액으로 3회의 세척과정을 거친 뒤 1×10^7 cells/ml를 만들어 준다.

<93> Sca1 항체 이외에 CD45, Ter119, SSEA1, SSEA3 항체도 동일한 과정에 의해 준비된다.

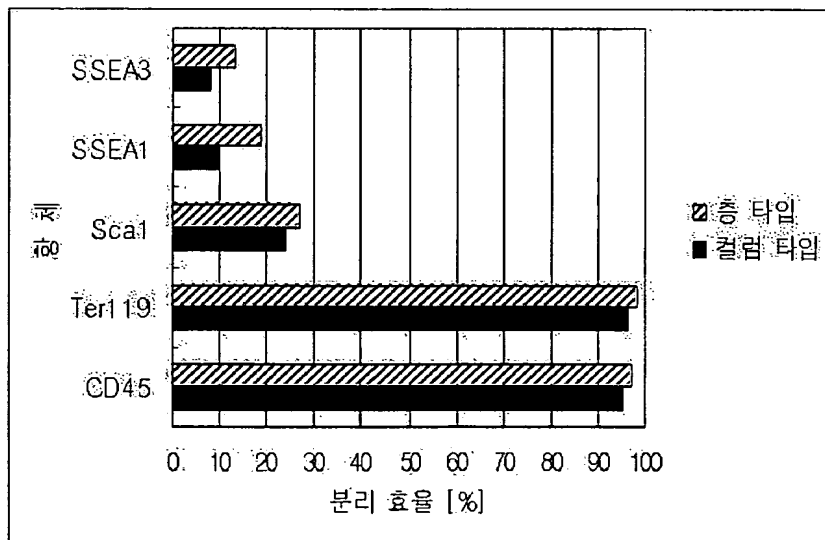
<94> 3. 실험 결과

<95> 각각의 항체에 대한 세포 혼합액으로부터 특정 세포를 분리하기 위해 사용된 세포 혼합액의 부피는 70 μ l이며, 온도에 대한 영향을 배제시키기 위해 세포 분리과정을 4℃의 저온실에서 실시하였다.

<96> 1) 특정세포(포지티브)

<97> 각각의 세포 분리를 통해 분리된 특정 세포를 포지티브(Positive)로 하고, 특정 세포 이외 나머지 세포들을 네거티브(Negative)라고 정의했을 때, 여러 가지 다른 항체를 사용하여 층 타입 분리기와 컬럼 타입 분리기에 의한 포지티브 분리 효율 결과는 다음과 같다.

【표 1】



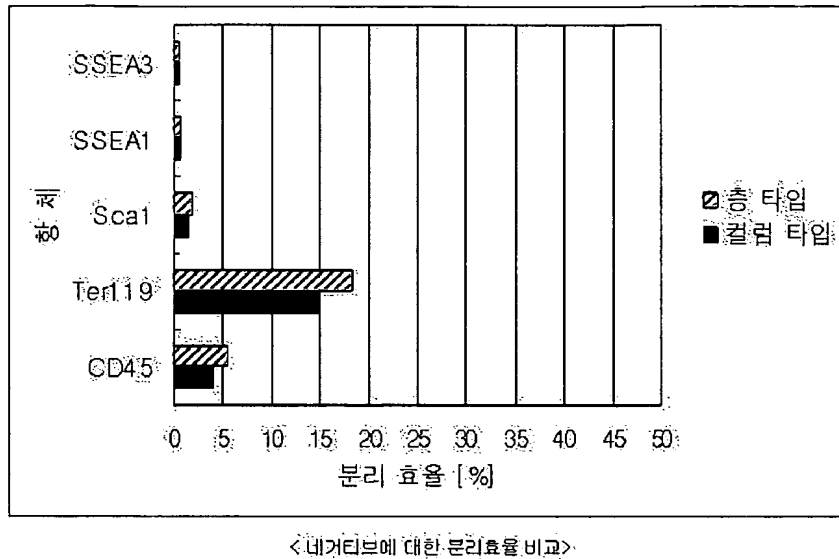
〈포지티브에 대한 분리 효율 비교〉

<99> 세포 혼합액에 포함되어 있는 특정 세포의 비율이 높아질수록(CD45 항체와 Ter119 항체로 레이블링 된 세포 혼합액의 경우 혼합액 내에 특정세포의 혼합비는 각각 80%와 15% 정도) 컬럼형 세포 분리기에 의해 분리되는 분리 효율과 근소한 차이로 분리 효율이 높으나, 특정 세포의 비율이 낮아질수록(Sca1 항체나 SSEA1항체 및 SSEA3 항체의 경우 1% 미만 정도로 세포 혼합액 내에 특정세포가 존재) 층 타입 분리기에 의한 분리 효율이 배로 높음을 알 수 있다.

<100> 2) 특정세포이외의 나머지 세포(네거티브)

<101> 각각의 세포 분리를 통해 분리된 특정 세포 이외에 나머지 세포, 즉 네거티브(Negative)를 수집한 후, 분리 에러 율(Error ratio, 포지티브가 제대로 분리되지 않은 채 네거티브에 남아있는 비율)을 확인한 결과이다.

【표 2】



<103> 전체적으로, 컬럼 타입에 비해 에러율이 같거나 근소한 차이로 높음을 알 수 있다. 특히, 세포 혼합액에 포함되어 있는 특정 세포의 비율이 높아질수록 (CD45 항체와 Ter119 항체로 레이블링 된 세포 혼합액의 경우 혼합액 내에 특정세포의 혼합비는 각각 80%와 15% 정도) 컬럼 타입 분리기에 의해 분리되는 분리 에러율 보다 근소한 차이로 높으나, 특정 세포의 비율이 낮아질수록(Sca1 항체나 SSEA1 항체 및 SSEA3 항체의 경우 1% 미만 정도로 세포 혼합액 내에 특정세포가 존재) 그 분리 에러율이 거의 같음을 알 수 있다.

<104> 3)실험 결과의 요지

<105> 네거티브 비율은 거의 비슷하면서, 특정세포가 회박하게 들어있는 세포 혼합액을 이용한 분리의 경우 포지티브의 비율이 배로 좋아짐을 확인할 수 있다.

<106> 이 발명은 상기의 실시 예에 한정되지 않으며, 특허청구범위에 기재되는 발명의 범위 내에서 다양한 변형이 가능하고, 이러한 변형도 이 발명의 범위 내에 포함된다.

【발명의 효과】

<107> 이상에서 상세하게 설명한 바와 같이, 이 발명의 세포혼합액 층에 자력을 인가하여 세포를 분리하는 장치 및 방법에 의하면, 분리하고자 하는 특정세포가 혼합되어 있는 세포혼합액을 상판부와 하판부로 이루어지는 세포 분리용 세포혼합액 수용 칩으로 층을 형성시키고, 상기 세포혼합액 층의 상판부 측에서 자력을 가해 마그네틱 비드가 붙은 특정세포가 상판부 측으로 이동하게 되면서 상기 특정세포 이외의 나머지 세포들을 중력에 의해 상기 세포혼합액 층의 하판부 측으로 이동시켜 각각 분리되게 함으로써, 분리용 칩 형태의 장치로 구현하여 제작 공정의 단순화를 실현하여 낮은 비용으로 세포 분리를 가능하게 하며, 또한 분리 공정도 하나의 분리용 칩으로 세포나 마그네틱 비드의 크기에 구애됨이 없이 모든 종류의 세포들을 분리할 수 있고 분리할 때 파이펫팅과 같은 추가 공정이 지속적으로 요구되는 것도 아니어서 빠른 시간 내에 효과적으로 필요로 하는 세포를 간편하게 채취할 수 있으며, 하판부에 세포혼합액이 수용된 상태이므로 안정적으로 효율 높은 세포 분리를 할 수 있게 된다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

상판부와;

상기 상판부의 하부에 마주하면서 위치하며, 마그네틱 비드가 부착된 특정 세포가 혼합되어 있는 세포혼합액을 수용하는 세포혼합액 수용부가 상측면에 구비되는 하판부;

상기 상판부의 상측면에 설치되는 자력 인가수단; 및,

상기 상판부에 결합되어, 상기 세포혼합액 수용부에 수용된 세포혼합액이 상기 상판부와 하판부 사이에서 층이 형성되게 상판부를 하판부에 가까워지도록 이동시키거나 또는 상기 자력 인가수단에서 인가되는 자력에 의해 상기에서 형성된 세포혼합액 층의 상판부 측으로 이동된 특정세포와 중력에 의해 상기 세포혼합액 층의 하판부 측으로 이동되어지는 특정세포 이외의 나머지 세포들이 각각 분리되게 상기 상판부를 하판부에서 멀어지도록 이동시키는 상판부 이동수단;을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포혼합액 층에 자력을 인가하여 세포를 분리하는 장치.

【청구항 2】

제 1항에 있어서,

상기 상판부 이동수단은, 상기 세포혼합액 층이 형성된 상판부와 하판부 사이의 이격 거리를 조절하여 세포의 분리를 최적화하는 상태로 유지되도록 상기 상판부를 이동시키는 것을 특징으로 하는 세포혼합액 층에 자력을 인가하여 세포를

분리하는 장치.

【청구항 3】

마그네틱 비드가 부착된 특정세포가 혼합되어 있는 세포혼합액을 수용하는 세포 분리용 세포혼합액 수용 칩에 자력을 인가하여 필요로 하는 세포를 분리하는 장치에 있어서,

상기 세포혼합액 수용 칩은,

상판부와, 상기 상판부의 하부에 마주하면서 위치하며 상기 세포혼합액을 수용하는 세포혼합액 수용부가 상측면에 구비된 하판부로 이루어지고,

상기 세포혼합액이 층을 형성하도록 상기 상판부와 세포혼합액이 수용된 하판부가 가까워지게 하거나 또는 상기에서 형성된 세포혼합액 층의 상판부 측에서 인가되는 자력에 의해 상판부 측으로 이동된 특정세포와 중력에 의해 하판부 측으로 이동되어진 특정세포 이외의 나머지 세포들이 각각 분리되도록 상기 상판부와 하판부가 멀어지게 하는 것을 특징으로 하는 세포혼합액 층에 자력을 인가하여 세포를 분리하는 장치.

【청구항 4】

제 3항에 있어서,

상기 상판부는, 친수성 물질이고, 상기 세포혼합액 수용부에 대응하는 위치와 크기를 갖는 부분의 주위를 소수성 물질의 경계 띠로 둘러싸면서 경계를 형성시킨 것을 특징으로 하는 세포혼합액 층에 자력을 인가하여 세포를 분리하는 장치.

【청구항 5】

제 3항에 있어서,

상기 상판부는, 소수성 물질이고, 상기 세포혼합액 수용부에 대응하는 위치와 크기를 갖는 부분을 친수성 물질로 코팅한 것을 특징으로 하는 세포혼합액 층에 자력을 인가하여 세포를 분리하는 장치.

【청구항 6】

제 3항에 있어서,

상기 하판부는, 친수성 물질이고, 상기 세포혼합액 수용부의 세포혼합액이 수용되는 부분의 주위를 소수성 물질의 경계 띠로 둘러싸면서 경계를 형성시킨 것을 특징으로 하는 세포혼합액 층에 자력을 인가하여 세포를 분리하는 장치.

【청구항 7】

제 3항에 있어서,

상기 하판부는, 친수성 물질이고, 상기 세포혼합액 수용부가 홈을 형성한 것을 특징으로 하는 세포혼합액 층에 자력을 인가하여 세포를 분리하는 장치.

【청구항 8】

제 3항에 있어서,

상기 하판부는, 소수성 물질이고, 상기 세포혼합액 수용부를 친수성 물질로 코팅한 것을 특징으로 하는 세포혼합액 층에 자력을 인가하여 세포를 분리하는 장치.

【청구항 9】

하판부에 수용된 마그네틱 비드가 부착된 특정세포가 혼합되어 있는 세포혼합액을, 상기 하판부의 상부에 마주하면서 위치하는 상판부 사이에서 세포혼합액 층으로 형성시키는 단계와;

상기 단계에서 형성된 세포혼합액 층의 상기 상판부 측에서 자력을 인가하여 세포혼합액 층의 상판부 측으로 특정세포를 이동시키면서 중력에 의해 특정세포 이외의 나머지 세포들도 세포혼합액 층의 하판부 측으로 이동되어지게 하는 단계; 및,

상기 단계에서 세포혼합액 층의 상판부 측으로 이동된 특정세포와 세포혼합액 층의 하판부 측으로 이동된 특정세포 이외의 나머지 세포들을, 상기 상판부와 하판부를 멀어지게 하여 상기의 세포혼합액 층이 없어지면서 각각 분리되게 하는 단계;로 이루어지는 것을 특징으로 하는 세포혼합액 층에 자력을 인가하여 세포를 분리하는 방법.

【청구항 10】

제 9항에 있어서,

상기 하판부에 세포혼합액을 수용시킨 후 일정 시간 동안 유지하여 상기 세포혼합액 내의 세포들이 충분히 가라앉은 상태가 되게 하는 단계;를 상기 세포혼합액 층으로 형성시키는 단계 이전에 수행하는 것을 특징으로 하는 세포혼합액 층에 자력을 인가하여 세포를 분리하는 방법.

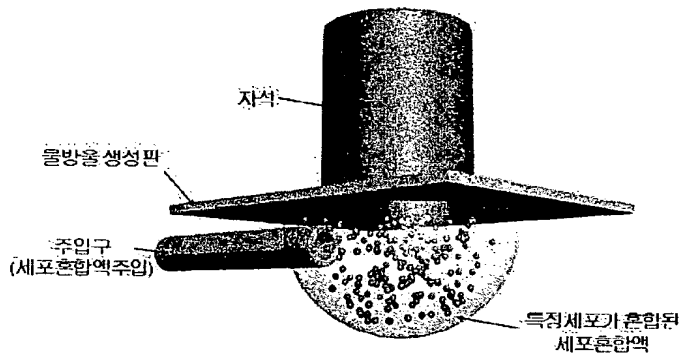
【청구항 11】

제 9항에 있어서,

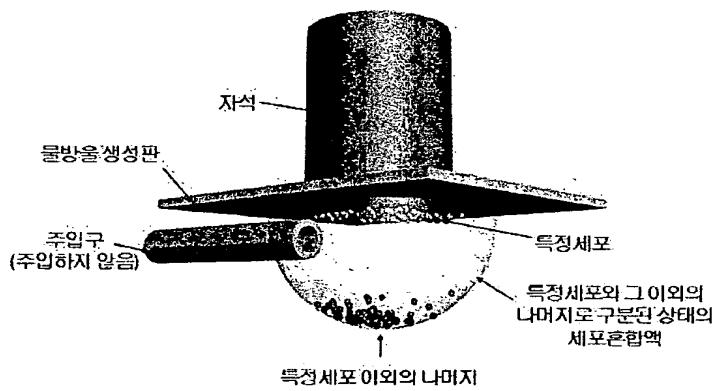
상기 상판부와 하판부 사이의 이격 거리를 조절하여 상기 세포혼합액 층의 폭이 세포 분리를 최적화시키는 상태로 유지되게 하는 단계;를 상기 세포혼합액 층으로 형성시키는 단계와 상기 세포혼합액 층의 상판부 측과 하판부 측으로 특정세포와 특정세포 이외의 나머지 세포들이 각각 이동되는 단계 사이에서 수행하는 것을 특징으로 하는 세포혼합액 층에 자력을 인가하여 세포를 분리하는 방법.

【도면】

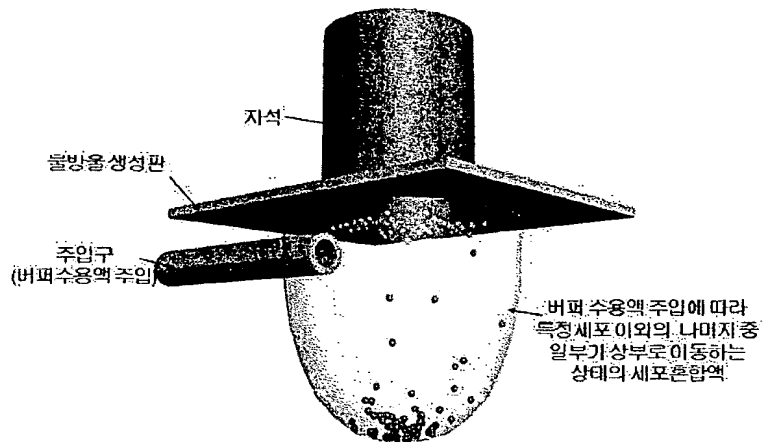
【도 1a】



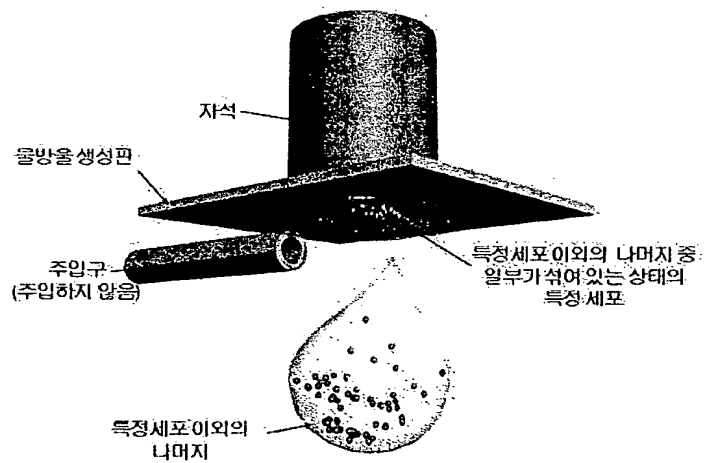
【도 1b】



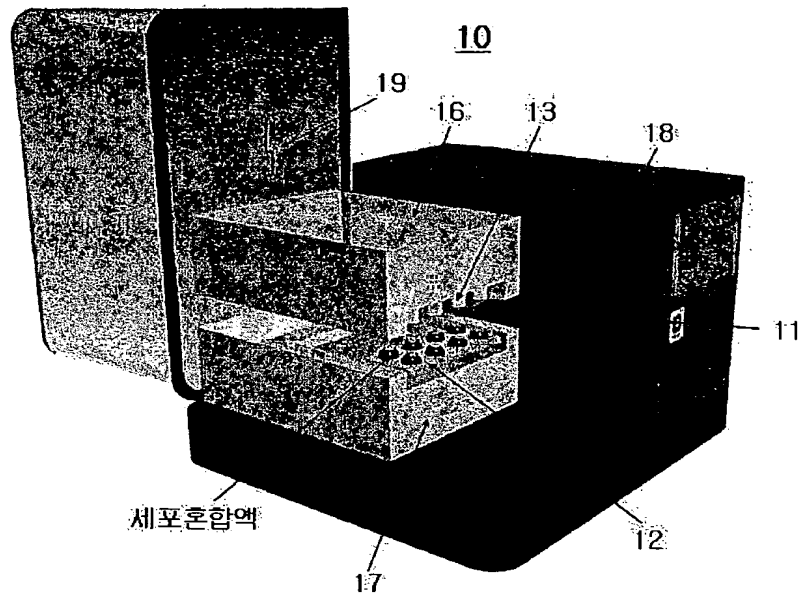
【도 1c】



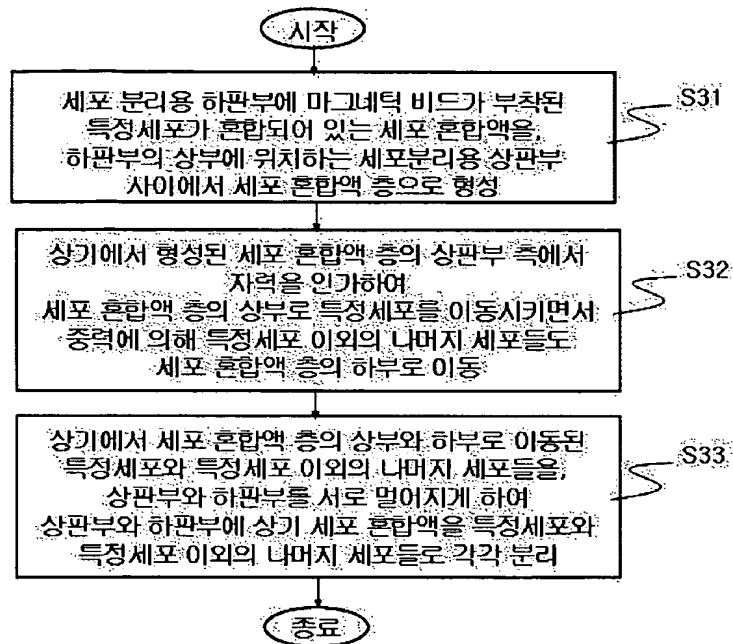
【도 1d】



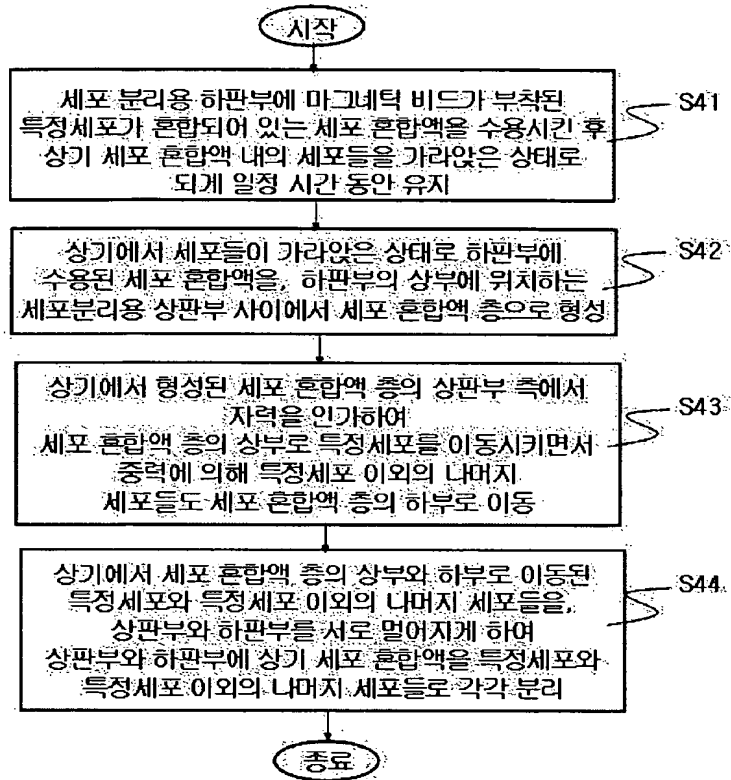
【도 2】



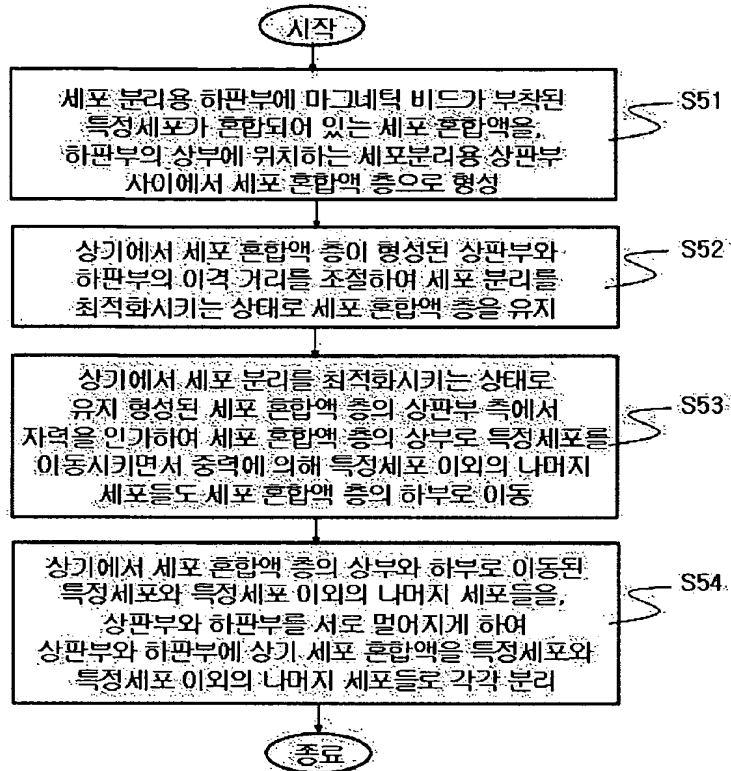
【도 3】



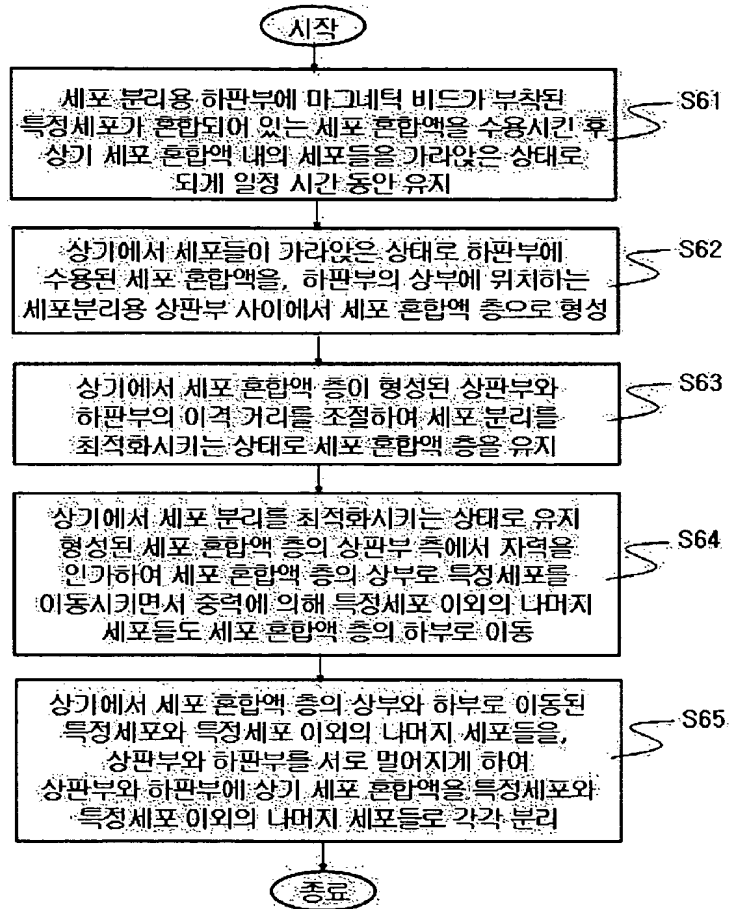
【도 4】



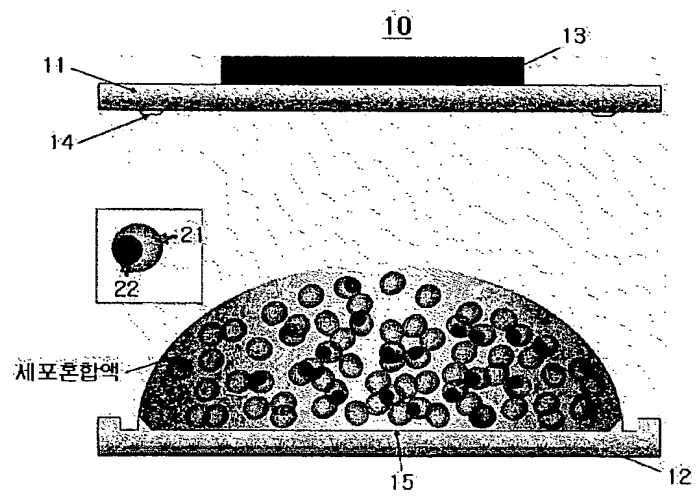
【도 5】



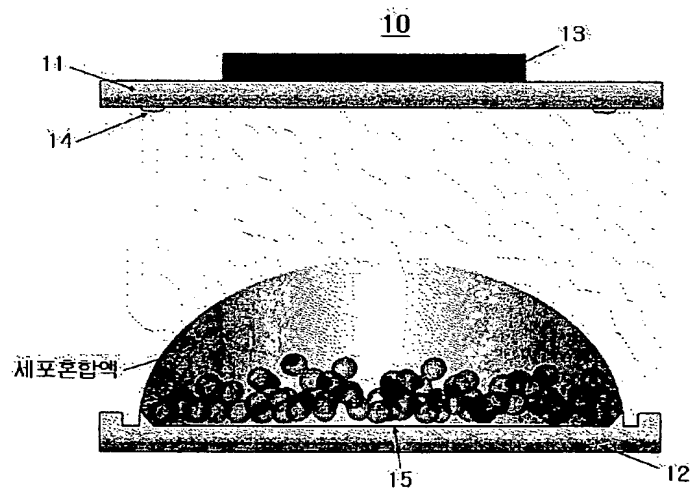
【도 6】



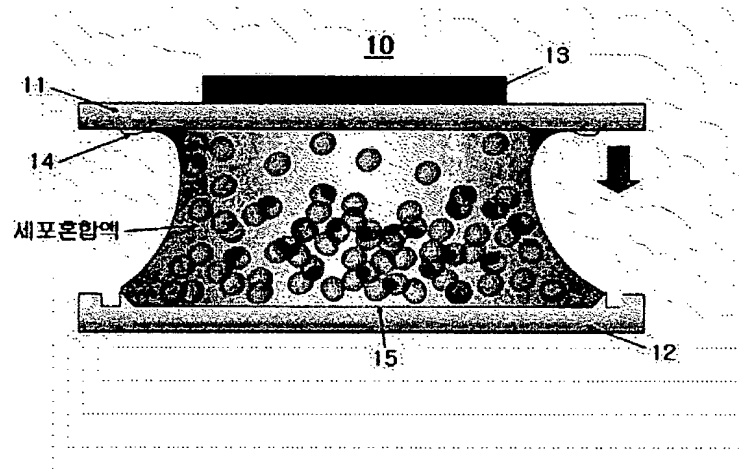
【도 7a】



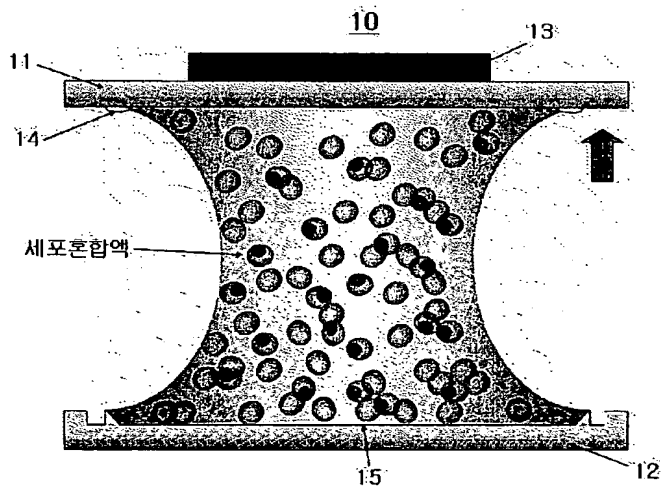
【도 7b】



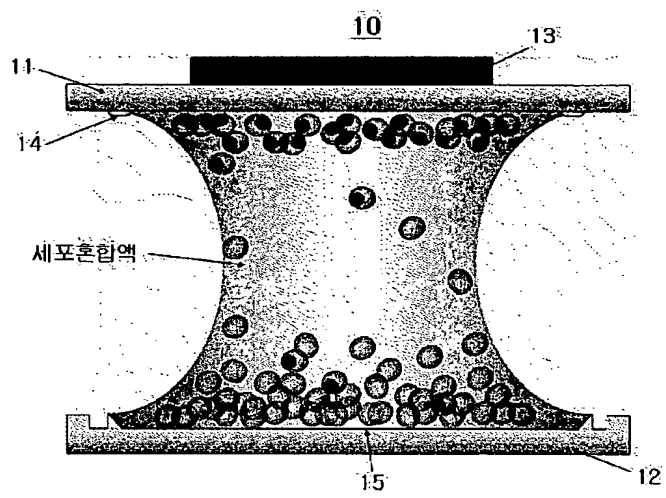
【도 7c】



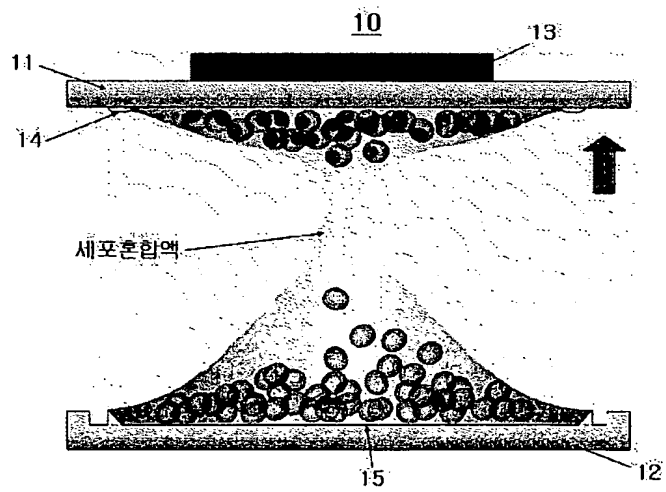
【도 7d】



【도 7e】



【도 7f】



【도 7g】

